

Thèse de Doctorat

Baptiste AMELINE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : INSERM UMR1089
Institut Atlantic Gene Therapies
Université de Nantes

Soutenu le 08 Septembre 2016, à Nantes.

Evaluation du transfert d'optogènes pour le traitement par thérapie génique d'un modèle canin de dystrophies rétiniennes héréditaires.

JURY

Rapporteurs : **Christian HAMEL**, Professeur, Université de Montpellier.
Knut STIEGER, Professeur, Justus-Liebig University, Germany.

Examineur : **Philippe MOULLIER**, Directeur de recherche, INSERM UMR1089.

Invitée : **Therese CRONIN**, Docteur.

Directeur de Thèse : **Fabienne ROLLING**, Directeur de recherche, INSERM UMR1089.

- LISTE DES ABREVIATIONS -

AAV : Adeno-Associated Virus
CAG : CMV early enhancer/chicken β actin
ChR2 : Channelrhodopsine-2, version H134R dans notre projet
CMV: Cytomégalo virus
CNTF : Ciliary neurotrophic factor
CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
Crd1 : Cone rod dystrophy 1
CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic regions
DRH : Dystrophie rétinienne héréditaire
eNpHR : Halorhodopsine, version 3.0 dans notre projet
eGFP : enhanced green fluorescent protein
EEG : Electro encéphalogramme
EPR : Epithélium pigmentaire rétinien
ERG : Electrorétinogramme
GCL : ganglion cell layer
GDNF : Glial-derived neurotrophic factor
GluR6 : Glutamate receptor 6
hSyn : human Synapsin-1
kb : kilo base
ILM : Inner limiting membran
INL : Inner nuclear layer
ITR : Inverted terminal repeat
LAP-4 : L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate
LCA : Leber congenital amaurosis
LiGluR : Light gated ionotropic glutamate receptor
MEA : Micro Electrode array
mpi : mois post-injection
mTOR : mammalian target of rapamycin
NFAT : Nuclear factor of activated T cells
NRF2 : Nuclear factor erythroid derived 2
ONL : Outer nuclear layer
Opn4 : opsine 4
PA : Potentiel d'action
pA : polyadénylation
Pde6: Phosphodiesterase 6
PEV : Potentiel Evoqué visuel
PEG : Polyéthylène glycol
rAAV : recombinant AAV
Rcd1 : Rod cone dystrophy 1
RCS : Royal college of surgeon
RdCVF : Rod derivated cone viability factor
RHO : Rhodopsine
Rpe65 : Retinal pigment epithelium 65 kDa
sd-OCT : spectral domain optical coherence tomography
siRNA : small interfering RNA
TALEN : Transcription activator like effector nuclease
ZFN : Zinc Finger Nuclease

- LISTE DES ILLUSTRATIONS -

FIGURE 1: Organisation anatomique de l'œil et de la rétine.....	p11
FIGURE 2: Les deux principaux cycles biochimiques des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire rétinien : cycle visuel et cascade de phototransduction.....	p13
FIGURE 3: Schéma de l'intégration par une cellule bipolaire ON de l'information lumineuse provenant des photorécepteurs, selon les conditions de luminosité.....	p16
FIGURE 4: Schéma récapitulatif de la transmission de l'information lumineuse des photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires rétiniennes.....	p18
FIGURE 5: Organisation et photosensibilité des cellules ganglionnaires à mélanopsine.....	p21
FIGURE 6: Evolution du nombre de gènes humains connus pour être impliqués dans des DRH, selon qu'ils soient uniquement identifiés ou bien localisés sur le génome.....	p22
FIGURE 7: Evolution progressive de l'épaisseur de la rétine périphérique d'un chien déficient pour le gène <i>Pde6β</i> , en coupe histologique.....	p27
FIGURE 8: Transformation du génome sauvage de l'AAV en génome recombinant contenant une cassette d'expression mammifère.....	p29
FIGURE 9: Différents types d'implants rétiniens.....	p43
FIGURE 10: Comparaison des mécanismes de photosensibilité entre la cascade de phototransduction des PRs et la réactivation des cellules ganglionnaires après la stimulation d'un optogène.....	p46
FIGURE 11: Comparaison des propriétés des optogènes channelrhodopsine (ChR2), mélanopsine (Opn4) et halorhodopsine (eNpHR).....	p49
FIGURE 12: Les stratégies de thérapie génique envisageables selon le stade de dégénérescence....	p52
FIGURE 13: Spectres d'absorption et intensités lumineuses requises pour l'activation de différents optogènes <i>in vivo</i>	p57
FIGURE 14: Répartition anatomique des cônes dans une rétine de primate.....	p61
FIGURE 15: Répartition anatomique des photorécepteurs dans une rétine canine.....	p62
FIGURE 16: Tropisme des différents sérotypes d'AAV selon la voie d'administration dans l'œil.....	p68
FIGURE 17: Profil de transduction de vecteurs rAAV2/2.eGFP après injection intravitréenne chez des modèles gros animaux.....	p72
FIGURE 18: Identification de la séquence codante du transcrit Opn4 canin.....	p92
FIGURE 19: Résumé des cassettes d'expression contenant les transgènes optogénétiques, ainsi que les concentrations des vecteurs rAAV2/2 associés.....	p93
FIGURE 20: Validation de la transcription des transgènes optogénétiques par RT-PCR après transfert d'optogènes.....	p95
FIGURE 21: Validation de l'expression des optogènes ChR2 et Opn4h après transfection de cellules humaines HEK293.....	p96
FIGURE 22: Principe du fonctionnement de la sonde calcique Fura-2AM en présence ou non d'un optogène <i>opn4</i> fonctionnel.....	p98
FIGURE 23: Evaluation de la fonctionnalité des optogènes Opn4h et Opn4c à l'aide d'une sonde calcique fluorescente.....	p99
FIGURE 24: Profil de transduction de l'eGFP suite à l'injection de vecteurs rAAV2/2 par voie intravitréenne chez des rats sains.	p101

FIGURE 25: Profil de transduction après injection intravitreuse de vecteurs rAAV2/2 hSyn.Optogènes dans les cellules ganglionnaires de rats sains.	p103
FIGURE 26: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans les cellules ganglionnaires du chien sain iMac.	p109
FIGURE 27: Evaluation des fonctions rétinienne par électrorétinographie du chien Guess Rpe65 ^{-/-} injecté avec le vecteur rAAV2/2.hSyn.Opn4h.....	p112
FIGURE 28: Evaluation des fonctions rétinienne par électrorétinographie du chien Extreme Rpe65 ^{-/-} injecté avec le vecteur rAAV2/2.hSyn.Opn4h.....	p113
FIGURE 29: Evaluations des réponses corticales de modèles rongeurs et canins par enregistrement du potentiel évoqué visuel.	p116
FIGURE 30: Evaluation de la vision basée sur un test de comportement visuel, chez un chien Rpe65 ^{-/-} traité sur l'oeil droit avec un vecteur AAV2/5.Rpe65.	p119
FIGURE 31: Validation de la transcription des transgènes optogénétiques, par RT-PCR, après transfert d'optogènes chez des modèles canins.	p122
FIGURE 32: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans la couche des cellules ganglionnaires du chien Eroïne déficient pour le gène Rpe65.	p123
FIGURE 33: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans les cellules ganglionnaires du chien Jolly, déficient pour le gène Rpe65.	p124
FIGURE 34: Représentation des zones rétinienne analysées par puce MEA.	p126
FIGURE 35: Restauration de la photosensibilité de la rétine du chien Jobi Rpe65 ^{-/-} après transfert de l'optogène opn4h au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.	p129
FIGURE 36: Absence de restauration de la photosensibilité de la rétine du chien Guess Rpe65 ^{-/-} après transfert de l'optogène opn4h au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.	p130
FIGURE 37: Absence de restauration de la photosensibilité de la rétine des chiens Rpe65 ^{-/-} Juvamine et Jerk, après transfert de l'optogène ChR2 au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.	p132
FIGURE 38: Comparaison de l'épaisseur des rétines de chiens Rpe65 ^{-/-} , avant et plus de 8 mois après transfert des optogènes Opn4h, ChR2 et eNpHR.	p135
FIGURE 39: Comparaison de l'épaisseur de la rétine du chien Fripon Rpe65 ^{-/-} , avant et 14 mois après transfert de l'optogène eNpHR.	p136
FIGURE 40: Comparaison de l'épaisseur de la rétine du chien Guess Rpe65 ^{-/-} , avant et 15 mois après transfert de l'optogène Opn4h.	p137
TABLEAU 1: Résumé de l'ensemble des essais cliniques de thérapie génique visant à traiter l'amaurose congénitale de Leber de type II causée par la déficience du gène Rpe65.	p34
TABLEAU 2: Résumé des expériences réalisées, selon le modèle animal et l'optogène utilisé.	p105
Tableau 3: Détails des procédures chirurgicales de l'ensemble des chiens impliqués dans le projet de transfert d'optogènes.	p106
TABLEAU 4: Synthèse des résultats obtenus lors de l'évaluation de la présence des produits du transgène, des enregistrements ERG et MEA ainsi que lors de l'évaluation de la tolérance par suivis funduscopiques et tomographiques, pour l'ensemble des chiens injectés.	p107
TABLEAU 5: Suivi des fonctions rétinienne par ERG, selon le protocole standard, de l'ensemble des chiens Rpe65 ^{-/-} injectés avec un vecteur transportant une cassette d'expression pour un optogène.....	p111

- SOMMAIRE -

INTRODUCTION

I. Fonctionnement normal de l'œil face à la lumière.

A. Le trajet de l'information lumineuse dans l'œil.....	10
1. Les tissus favorisant la captation de la lumière par la rétine.....	10
2. L'organisation du réseau rétinien.	10
B. Le traitement de l'information lumineuse conduisant à la formation d'images.	13
1. La phototransduction des photorécepteurs.	13
2. le système ON/OFF des cellules bipolaires dans la transmission de l'information lumineuse.....	15
3. L'antagonisme centre - périphérie des cellules ganglionnaires.	17
C. Le traitement de l'information lumineuse par les cellules ganglionnaires à mélanopsine.	19
1. Propriété de la mélanopsine.	19
2. Rôle des cellules ganglionnaires à mélanopsine.	19
D. L'altération des fonctions visuelles par les dystrophies rétiniennes héréditaires.	22
1. Généralités et critères de classification.	22
2. Les étapes caractéristiques d'une dégénérescence rétinienne.	23

II. La réactivation des cellules rétiniennes comme traitement des DRH.

A. Les thérapies géniques permettant le maintien ou la restauration des fonctions rétiniennes par l'action naturelle des photorécepteurs.	27
1. Les vecteurs viraux adéno-associés.	27
2. Les thérapies géniques.....	30
3. L'apport des thérapies géniques d'addition et de correction pour palier aux limites de la thérapie génique de remplacement.	35
a. Les thérapies géniques d'addition spécifique basées sur des couples de vecteurs.....	35
b. Les thérapies géniques correctives.	35
c. Les thérapies géniques d'addition basées sur l'utilisation d'ARN interférents.....	37
d. Les thérapies géniques d'addition non spécifique basées sur des facteurs neuroprotecteurs.	37

B. L'implantation de puces électroniques pour réactiver la rétine.	38
1. Principe des prothèses électroniques.	38
a. Les implants sous-rétiniens.	39
b. Les implants épirétiniens.	40
2. Les limites et les pistes d'amélioration.	41
C. Le transfert d'optogènes selon le stade de dégénérescence.	44
1. Principe du transfert d'optogènes.	44
2. Mode d'action et propriétés des optogènes Opn4, ChR2 et eNpHR.	47
3. Traitement de modèles rongeurs de DRH.	50
a. Par transfert d'optogènes dans les cônes dormants.....	50
b. Par transfert d'optogènes dans les cellules bipolaires ON.	53
c. Par transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires.	54
III. L'évaluation du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires canines.	
A. Intérêt de l'évaluation du transfert de gènes chez un modèle gros animal tel que le chien.	58
B. L'avantage du modèle canin <i>Rpe65^{-/-}</i> pour une preuve de concept du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires rétiniennes.	63
C. Optimisation du taux de transduction dans les cellules ganglionnaires canines.	65
1. Mode d'injection et choix du sérotype AAV.	65
2. Choix du sérotype AAV pour la transduction des cellules ganglionnaires.....	66
3. Optimisation de la transduction par voie intravitréenne au travers des barrières anatomiques naturelles de l'œil.	69

RESULTATS

I. Publication : <i>Vitrectomy before intravitreal injection of AAV2/2 vector promotes efficient transduction of retinal ganglion cells in dogs and nonhuman primates</i>.....	75
II. Résultats des expériences de la partie optogénétique.....	90
A. Mise en place des conditions permettant une évaluation du transfert d'optogènes chez le chien.....	90
1. Séquençage et sous-clonage des séquences optogénétiques dans des plasmides vecteurs AAV.....	90
2. Evaluation in vitro de la fonctionnalité des plasmides vecteurs contenant les optogènes..	94
3. Evaluation in vitro de la fonctionnalité des optogènes Opn4 humains et canins.....	97

4. Production des vecteurs viraux à partir des plasmides vecteurs contenant les cassettes d'expression codant pour les quatre optogènes sous promoteur spécifique hSyn.....	100
5. Evaluation de l'expression des produits de transgènes et de leur tolérance chez des rats sains.....	102
B. Evaluation du transfert d'optogènes chez le chien.....	104
1. Evaluation de l'expression des produits du transgène et de leur tolérance chez des chiens sains.....	108
2. Evaluation de la restauration des fonctions électrorétinographiques (ERG) suite au transfert d'optogènes chez le modèle canin Rpe65 ^{-/-}	110
3. Mise au point d'une évaluation du potentiel évoqué visuel (PEV) avec implantation des électrodes en position épidurale ou sous-durale.....	114
4. Mise en place d'un test de comportement canin basé sur une perception lumineuse.....	117
5. Evaluation de l'expression des produits du transgène après transfert d'optogènes chez le chien Rpe65 ^{-/-}	120
6. Evaluation <i>ex vivo</i> de la restauration des fonctions rétinienne, par analyse à l'aide d'une puce de micro électrodes en ligne (MEA), de la réponse des cellules ganglionnaires canines à des stimulations lumineuses.....	125
7. Etude de la tolérance du transfert d'optogènes par voie intravitréenne chez des chiens déficients pour le gène Rpe65.....	133
Conclusion des résultats de la partie optogénétique.....	138
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	90
MATERIEL & METHODE.....	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	166

- INTRODUCTION -

I. Fonctionnement normal de l'œil face à la lumière.

A. Le trajet de l'information lumineuse dans l'œil.

L'œil est l'organe de la vision. Bien que les différents constituants de l'œil (Fig. 1A) jouent un rôle dans la perception de l'information lumineuse, seul un tissu est directement sensible à la lumière: la rétine. Ainsi toutes les structures anatomiques traversées par la lumière dans l'œil tendent à focaliser les rayons lumineux sur la rétine.

1. Les tissus favorisant la captation de la lumière par la rétine.

En premier lieu, la lumière traverse la cornée qui réfracte les faisceaux de lumière, ceux-ci passent alors au travers de la pupille, et se dirigent vers le cristallin. Pour ne pas obstruer le passage de la lumière, la cornée est dépourvue de vascularisation et s'approvisionne par l'intermédiaire de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure située derrière elle. Avant d'atteindre le cristallin la lumière passe à travers la pupille, espace vacant au centre de l'iris qui joue un rôle de diaphragme en régulant l'influx lumineux. L'excès de lumière étant dommageable pour la rétine, la dilation de l'iris permet le passage d'une quantité moindre de lumière. Suite à son passage dans la pupille, la lumière traverse le deuxième élément majeur de la réfraction de la lumière : le cristallin. Il permet de focaliser les rayons lumineux sur la rétine quelle que soit la distance de l'objet observé. Pour pouvoir maintenir une convergence des rayons lumineux sur la rétine malgré la distance variable de l'élément observé, il doit sans cesse modifier sa courbure et donc sa vergence. Ce phénomène, appelé l'accommodation, est rendu possible par l'action des muscles ciliaires qui déforment le cristallin en l'allongeant quand l'objet est éloigné. Le cristallin est, lui aussi, dépourvu de vaisseau sanguin et les cellules qui le composent sont dépourvues de noyau et d'autre organelle pouvant former un obstacle au passage de la lumière. Enfin, la lumière traverse la rétine, mais il arrive parfois que tous les photons ne soient pas captés par cette dernière. On peut donc évoquer le rôle de l'épithélium pigmentaire rétinien, situé encore plus en aval dans le trajet de la lumière, qui, de par sa pigmentation, va limiter la diffusion indésirable des rayons lumineux non perçus.

2. L'organisation du réseau rétinien.

La rétine est à la base de la formation des images mais elle joue aussi un grand rôle dans la régulation du cycle circadien et du réflexe pupillaire. Si on s'intéresse de plus près au tissu rétinien (Fig. 1B et

1C), on remarque une succession de trois couches nucléaires séparées par des zones synaptiques, appelées couches plexiformes presque dépourvues de noyau. Si on parcourt la rétine en partant du vitré en direction de l'épithélium pigmentaire, on remarque que le point le plus interne de la rétine est délimité par une membrane appelée la membrane limitante interne. Elle fait face d'un côté à la membrane hyaloïde qui contient le corps vitréen et de l'autre elle délimite le début de la couche des cellules ganglionnaires rétinienne. Comme son nom l'indique cette couche se constitue des sous-populations de cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique, qui conduit l'information lumineuse en direction du cerveau. Leurs dendrites forment des synapses avec les axones des cellules bipolaires et amacrines dans la couche plexiforme interne. On retrouve aussi quelques corps cellulaires de cellules amacrines dans cette couche, mais la plupart des noyaux des cellules amacrines, des cellules bipolaires et des cellules de Müller se trouvent dans la couche dite nucléaire, interne située au-dessus. Toujours en progressant vers l'extérieur de l'œil, on trouve une couche plexiforme, qualifiée d'externe, où se retrouvent les connexions entre les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les photorécepteurs. Enfin, encore plus en externe, on distingue la couche des noyaux des cellules horizontales et des photorécepteurs: la couche nucléaire externe, elle-même surplombée par les segments internes puis externes des photorécepteurs. Les cils connecteurs des photorécepteurs se trouvent à la jonction entre les segments internes et externes, et forment un réseau relié par la membrane limitante externe. Les segments externes définissent la fin de la rétine, mais il nous faut quand même évoquer le tissu dans lequel ils sont enchâssés : l'épithélium pigmentaire rétinien. On comprend ainsi que la lumière, qui arrive par la couche des cellules ganglionnaires, traverse toute la rétine avant d'être éventuellement captée au niveau des segments externes des photorécepteurs.

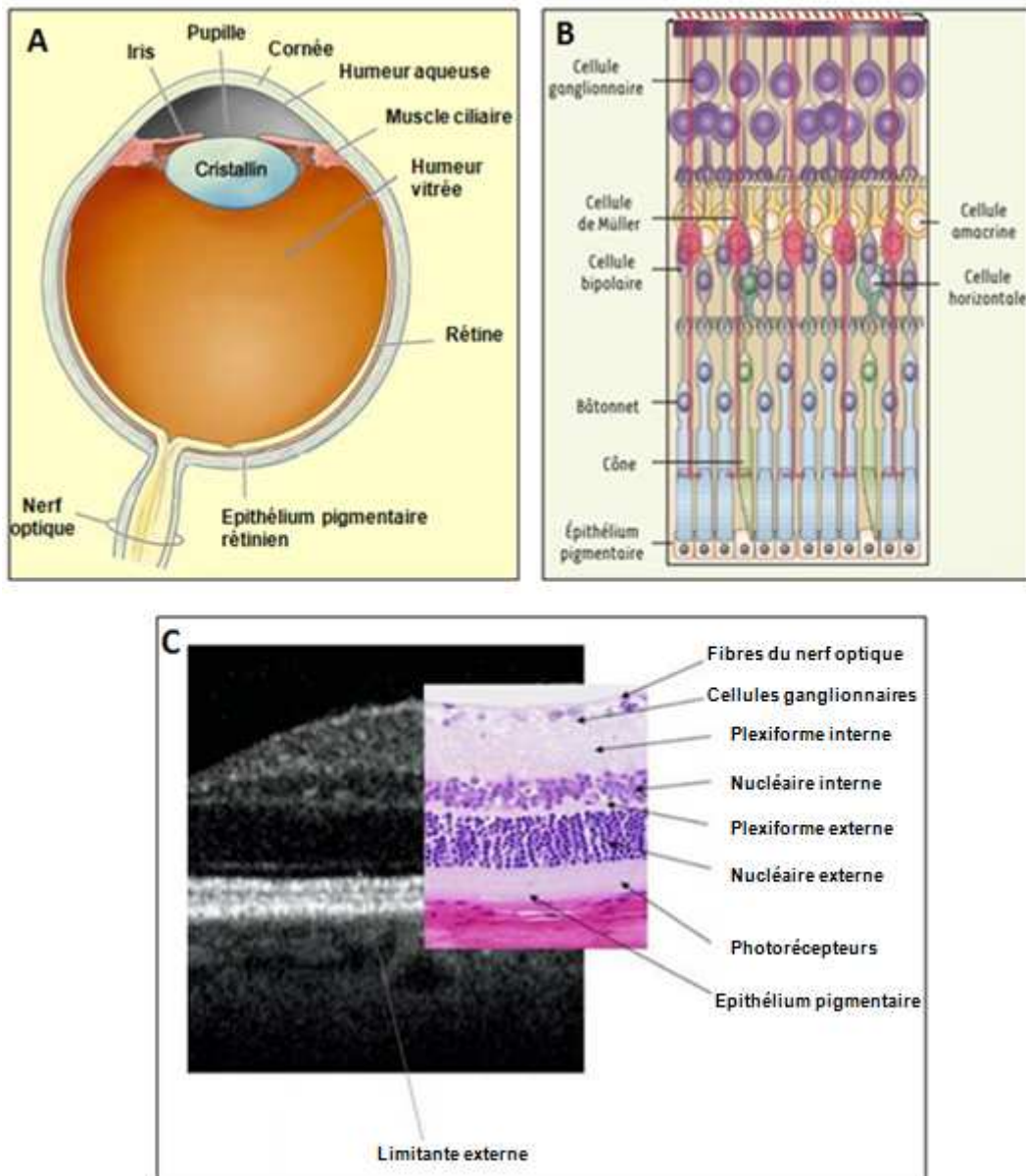


Figure 1 : Organisation anatomique de l'œil et de la rétine.

(A) Structure de l'œil humain. (Source: lecerveau.mcgill.ca/)

(B) Schéma de l'organisation de la rétine. (D'après : khabou et dalkara, 2015)

(C) Juxtaposition d'une image par tomographie à cohérence optique (OCT) et d'une coupe histologique de rétine. (Source : <http://lodel.irevues.inist.fr/>)

B. Le traitement de l'information lumineuse conduisant à la formation d'images.

1. La phototransduction des photorécepteurs.

De toutes les cellules qui constituent la rétine, seuls les photorécepteurs, se situant dans la couche nucléaire externe, peuvent initier le processus de formation d'une image, de par leur capacité à exprimer des protéines sensibles à la lumière : les opsines. L'opsine des bâtonnets est la rhodopsine alors que les cônes peuvent exprimer distinctement trois opsines différentes sensibles à des spectres lumineux distincts : l'opsine-s pour les cônes bleus, l'opsine-m pour les cônes verts et l'opsine-l pour les cônes rouges. La vision repose sur la capacité de ces protéines à capter un photon et à initier une cascade d'activation aboutissant à la fermeture de canaux ioniques présents à la surface des photorécepteurs (Fig. 2B). La conséquence de la fermeture des canaux est la variation du potentiel de membrane ayant pour résultat une hyperpolarisation du photorécepteur induisant une sécrétion amoindrie de neurotransmetteurs glutamates dans la synapse. A noter que la quantité de glutamate sécrétée sera inversement proportionnelle à l'intensité de la stimulation lumineuse. L'ensemble de ce processus de transformation de l'information lumineuse en signaux électriques est appelé cascade de phototransduction.

La sensibilité de l'opsine à la lumière repose sur un dérivé de la vitamine A : le 11-cis retinal. Après avoir été excité par un photon, ce composé chimique change de conformation. Il est converti en tout-transretinal, qui n'est alors plus excitable par une stimulation ultérieure. Le tout-transretinal doit d'être recyclé pour être de nouveau photosensible. Ce cycle de recyclage des dérivés de la vitamine A, spécifique au fonctionnement des opsines des photorécepteurs, s'appelle le cycle visuel (Fig. 2A). Ce ne sont pas les photorécepteurs qui expriment les enzymes nécessaires à ce cycle mais les cellules de Müller et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Ainsi, les photorécepteurs bâtonnets nécessitent l'action d'enzymes exprimées dans l'EPR pour être réapprovisionnés en 11 cis-retinal. Pour ce faire, l'épithélium pigmentaire rétinien va phagocyter les segments externes des bâtonnets, contenant les opsines, à un rythme soutenu : chaque jour l'EPR phagocyte l'équivalent de 10% du volume d'un bâtonnet (Kevany and Palczewski 2010). Les cônes nécessitent, eux, l'action des cellules de Müller pour recycler leur photopigment (*Muniz et al. 2009*). Le cycle visuel est à la base de notre vision et il est source de nombreuses altérations de la vision. En effet, toute mutation altérant les fonctions de n'importe quelle protéine du cycle visuel (ex: Rpe65) ou de la cascade de phototransduction (ex: Pde6) aboutit systématiquement à une déficience génétique de la vision, comme c'est le cas pour deux de nos modèles canins décrits plus tard.

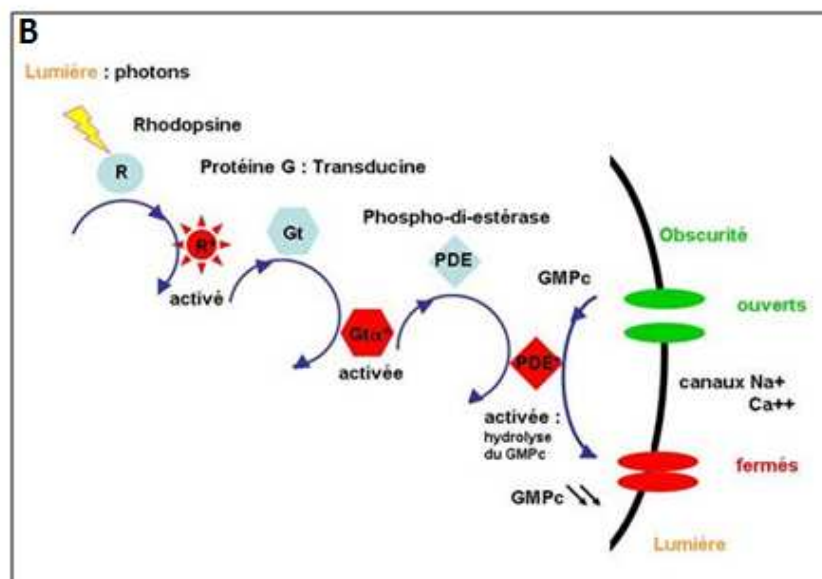
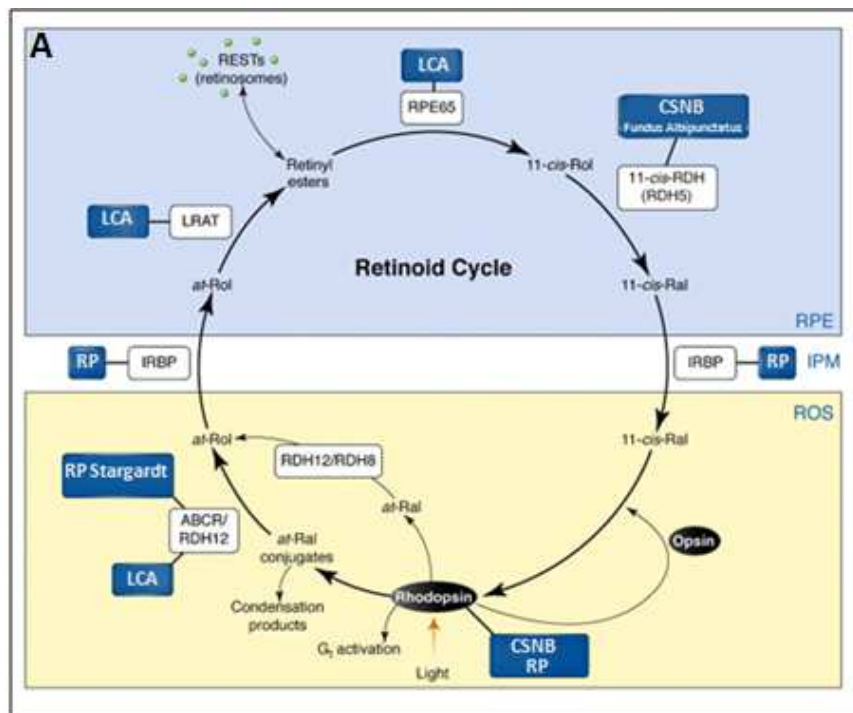


Figure 2 : Les deux principaux cycles biochimiques des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire rétinien : cycle visuel et cascade de phototransduction.

(A) Le cycle visuel des bâtonnets et les rétinopathies associées à la déficience des enzymes de ce cycle (D'après: von Lintig et al., 2013)

(B) Cascade de phototransduction dans les photorécepteurs bâtonnets (Source: <http://odel.irevues.inist.fr/>)

2. le système ON/OFF des cellules bipolaires dans la transmission de l'information lumineuse.

Ces signaux électriques générés au niveau des cônes et des bâtonnets, codant pour l'information lumineuse, sont ensuite transmis par l'intermédiaire des neurotransmetteurs glutamates aux neurones en aval : les cellules bipolaires. En réponse à l'information donnée par la concentration en neurotransmetteurs glutamates sécrétés, et selon les récepteurs agonistes ou antagonistes au glutamate qu'elles expriment, ces dernières vont moduler l'ouverture de leurs canaux ioniques et donc faire varier leur potentiel de membrane. On distingue deux grandes familles de cellules bipolaires ; les cellules ON ou OFF, selon qu'elles répondent à une diminution de glutamates respectivement par une dépolarisation (Fig. 3) ou par une hyperpolarisation. A l'inverse, une augmentation de sécrétion de glutamate par les photorécepteurs (consécutif à une baisse de la luminosité) aura exactement l'effet opposé sur chacune de ces deux populations : les cellules bipolaires ON s'hyperpolarisent (Fig. 3) et les cellules bipolaires OFF se dépolarisent. A noter que les bâtonnets ne forment des synapses qu'avec des cellules bipolaires ON alors que les cônes sont connectés aux deux populations. Enfin les cellules bipolaires de bâtonnets forment des synapses avec une population de cellules appelées les cellules amacrines AII qui sont elles-mêmes connectées aux bipolaires ON des cônes. Ce maillage supplémentaire ne change en rien le sens de la réponse ON mais cette particularité se devait d'être mentionnée.

La transmission de l'information électrique des cellules bipolaires aux cellules en aval, les cellules ganglionnaires, se fait là aussi par l'intermédiaire du glutamate. A l'image de la sécrétion de glutamate par les photorécepteurs, les cellules bipolaires en état d'hyperpolarisation sécrètent moins de glutamate alors que dans un état de dépolarisation la quantité relarguée dépasse le niveau basal.

Si je prends le temps de détailler le fonctionnement de ces deux sous populations bipolaires c'est qu'elles sont à l'origine de notre capacité à voir les contrastes. En effet, ces jeux de polarisation se font en réponse à une variation de neurotransmetteurs sécrétés par les photorécepteurs qui n'est que la conséquence directe d'une augmentation ou d'une diminution de stimulation lumineuse. Si toutes les cellules bipolaires répondaient de manières uniformes, la notion de contraste serait perdue. Le fonctionnement et le maintien du système ON/OFF des cellules bipolaires sont un enjeu majeur pour les stratégies thérapeutiques. En particulier la stratégie développée dans notre projet de transfert de gènes, dans la mesure où, sans ce système de contraste, la qualité de la vision rendue pourrait être profondément réduite.

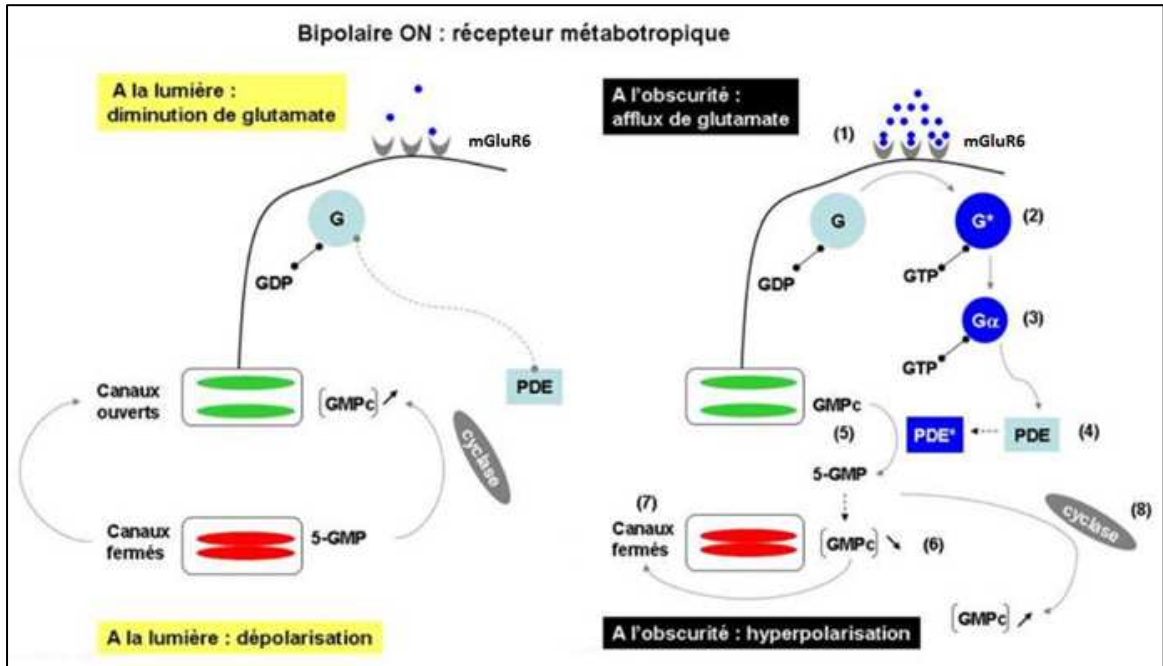


Figure 3 : Schéma de l'intégration par une cellule bipolaire ON de l'information lumineuse provenant des photorécepteurs, selon les conditions de luminosité.

(Source : <http://lodel.irevues.inist.fr/>)

3. L'antagonisme centre - périphérie des cellules ganglionnaires.

Les cellules bipolaires des cônes ne forment pas le dernier maillon du transit de l'information lumineuse dans la rétine. Elles transmettent leurs informations aux cellules ganglionnaires rétiniennes dont les axones forment le nerf optique et se projettent, pour la plupart, au niveau des corps géniculés latéraux, véritable relai avant le cortex visuel. La transmission d'une cellule bipolaire à une cellule ganglionnaire se fait ici aussi par l'intermédiaire du glutamate. Le système ON/OFF des cellules bipolaires se retrouve au niveau des cellules ganglionnaires rétiniennes avec une différence notable : une même cellule ganglionnaire centralise à la fois des réponses de cellules bipolaires ON et OFF. Mais les connections ON/OFF se font à des endroits différents sur la cellule ganglionnaire. Ces connections sont soit en contact avec le soma, soit en contact avec la périphérie. Ainsi, si les cellules bipolaires ON font des connections avec la cellule ganglionnaire au niveau de son soma alors la cellule ganglionnaire est dite de "centre ON" et va donc être excitée par une augmentation de luminosité. Cela se traduira par une augmentation de la fréquence des potentiels d'action dans la cellule ganglionnaire. Cette même cellule ganglionnaire à centre ON va de manière logique être inhibée et donc réduire la fréquence des potentiels d'action, en cas de baisse de la luminosité (Fig. 4). Cela est possible car les cellules bipolaires OFF, qui ne sont pas connectées au soma, le sont par contre avec la périphérie de la cellule. Cela leur permet d'émettre des signaux inhibiteurs en périphérie. En conséquence, dans une même cellule ganglionnaire il y a un antagonisme centre/périphérie qui permet la préservation du système de contraste ON/OFF débuté au niveau des cellules bipolaires. De manière analogue il existe des cellules ganglionnaires à centre OFF qui répondent de manière opposée aux cellules ganglionnaires à centre ON. Là encore, j'ai détaillé le fonctionnement du système de contraste au niveau des cellules ganglionnaires car il aide à mieux comprendre les enjeux du transfert d'optogènes ciblant les cellules ganglionnaires.

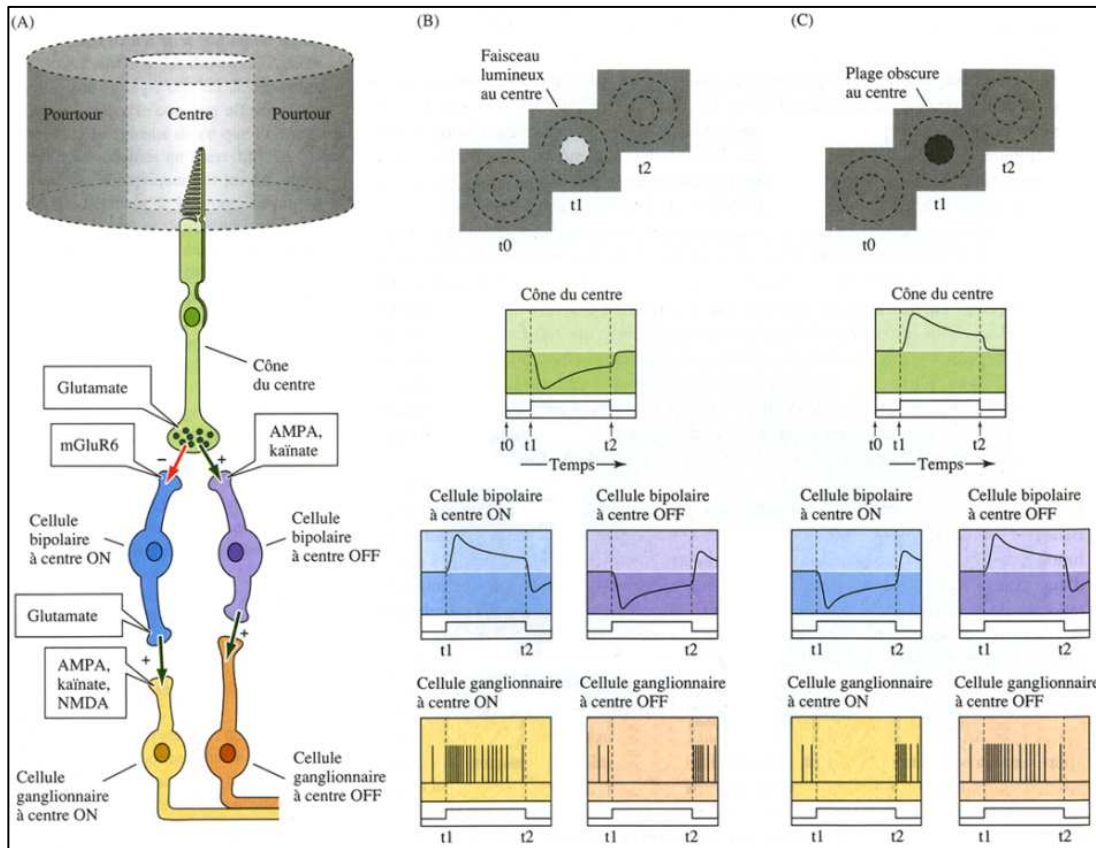


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la transmission de l'information lumineuse des photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires rétiniennes.

(A) Description fonctionnelle des récepteurs métabotropiques au glutamate selon l'orientation ON/OFF des cellules bipolaires et ganglionnaires.

(B) Représentation des variations de polarisation des photorécepteurs et des cellules bipolaires ainsi que la variation des fréquences des potentiels d'action des cellules ganglionnaires, lors d'une augmentation de la luminosité.

(C) Représentation des variations de polarisation des photorécepteurs et des cellules bipolaires ainsi que la variation des fréquences des potentiels d'action des cellules ganglionnaires, lors d'une diminution de la luminosité.

(D'après : Neuroscience 3^e, collection de boeck, D. Purves et al. 2004)

C. Le traitement de l'information lumineuse par les cellules ganglionnaires à mélanopsine.

Il existe un autre circuit de perception de la lumière dans la rétine, dont le rôle physiologique est encore débattu, et qui concerne directement et uniquement les cellules ganglionnaires. Il est basé sur une opsine découverte beaucoup plus récemment, en 2000, la mélanopsine, codée par le gène *opn4* (Provencio et al. 2000).

1. Propriété de la mélanopsine

Cette opsine sensible aux longueurs d'ondes bleues (λ absorption = 480nm) est un canal transmembranaire dont l'activation par un photon conduit, via l'ouverture de canaux calciques du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique, à la dépolarisation de la cellule (Fig. 5A). Ce qui est le résultat opposé de la stimulation d'une opsine de photorécepteur par un photon. De plus, autre particularité par rapport aux opsines exprimées dans les photorécepteurs : elle ne nécessite pas de système spécifique de recyclage et d'approvisionnement en dérivés de la vitamine A. Il semblerait que cette opsine sensible à la lumière bleue soit bistable et aurait donc des propriétés physiques lui permettant de retourner à un état excitable par l'absorption de lumière jaune orangée (Matsuyama et al. 2012). Cela rend son fonctionnement ectopique beaucoup plus simple et donc intéressant en transfert de gènes puisqu'il n'y a pas besoin des enzymes du cycle visuel. Enfin, dernière particularité notable, son temps de latence entre deux stimulations est de plusieurs secondes, soit 1000 fois plus long que celui des opsines des photorécepteurs (Dacey et al. 2005). Sa relative lenteur est peut-être à mettre en adéquation avec son rôle physiologique qui, contrairement à la vision, ne nécessite pas une réactivité d'une milliseconde.

2. Rôle des cellules ganglionnaires à mélanopsine

La mélanopsine est exprimée dans un sous-type bien particulier de cellules ganglionnaires représentant environ 2% des cellules ganglionnaires chez la souris et moins de 0,2% des cellules ganglionnaires chez les primates (Dacey et al. 2005).

On distingue actuellement 5 sous types de cellules ganglionnaires à mélanopsine (M1 à M5) définis selon leur stratification, leur zone de projection ou leur taux d'expression en mélanopsine (Fig. 5B) (Schmidt et al. 2011). Le sous-type le plus connu est le sous-type M1 principalement car il exprime fortement la mélanopsine et qu'il est donc bien plus simple à marquer. Reste maintenant à relier cette classification morphologique à une fonctionnalité, ce qui est loin d'être achevé. Les zones de projection des axones des cellules ganglionnaires à mélanopsine donnent un indice en ce sens :

- Le noyau suprachiasmatique, centre de contrôle du cycle circadien.
- Le noyau prétectal olivaire, centre du réflexe pupillaire.

- Les corps géniculés latéraux, relais synaptiques entre la rétine et le cortex visuel.

Les cellules ganglionnaires à mélanopsine ne sont pas les seules cellules de l'œil à exprimer le gène *Opn4*. De nombreuses espèces mammifères, dont les primates, expriment la mélanopsine dans les cellules de l'iris (Xue et al. 2011). De plus, il a été démontré que des explants d'iris murins, félins, canins, de lapin, en l'absence de la chambre postérieure, étaient capables de se contracter en présence de lumière. Ce qui fait de l'iris le second tissu directement photosensible de l'œil chez de nombreux mammifères non primates. Le rôle de la mélanopsine dans l'iris serait uniquement lié à la contraction de l'iris.

Dans la rétine, et plus précisément dans le sous-type de cellules ganglionnaires à mélanopsine, cette opsine serait un acteur majeur du réflexe pupillaire (système redondant avec l'action de la mélanopsine dans l'iris et l'information lumineuse provenant des photorécepteurs) et du maintien du cycle circadien (là aussi de manière redondante avec l'information lumineuse provenant des photorécepteurs). On ne sait toujours pas quel est le rôle des cellules ganglionnaires à mélanopsine projetant dans les corps géniculés latéraux. Cette voie mène normalement au codage de l'information lumineuse en vue de la formation d'image. De même une étude, publiée en 2014, fait état de cellules ganglionnaires à mélanopsine se projetant dans le colliculus supérieur, zone du cerveau associée à la détection de nouveaux objets dans le champs visuel (Zhao et al. 2014). Dans cette même publication, les 5 différents sous-types répondent à des variations de lumière de manière différente selon la taille de l'objet lumineux ou de sa vitesse de déplacement dans le champ visuel. Cependant ces réponses pourraient être commandées par l'action de cellules amacrines et non pas par l'activation des protéines mélanopsines, comme en témoigne l'étude des souris déficientes pour le gène *Opn4* et dont les cellules ganglionnaires à mélanopsine continuent à répondre à une augmentation de lumière (Pickard et al. 2009). On en déduit que les bipolaires ON ou éventuellement les cellules amacrines AII, stimulent les cellules ganglionnaires à mélanopsine. Ainsi, le rôle de la mélanopsine dans la vision est encore largement débattu même si celui des cellules ganglionnaires à mélanopsine, répondant par l'intermédiaire du système ON, ne l'est plus (Dacey et al. 2005, Pickard et al. 2009).

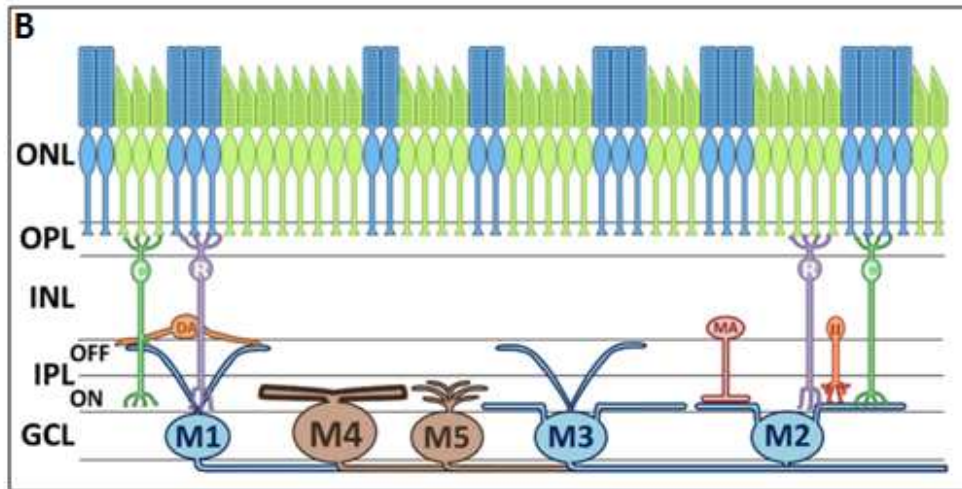
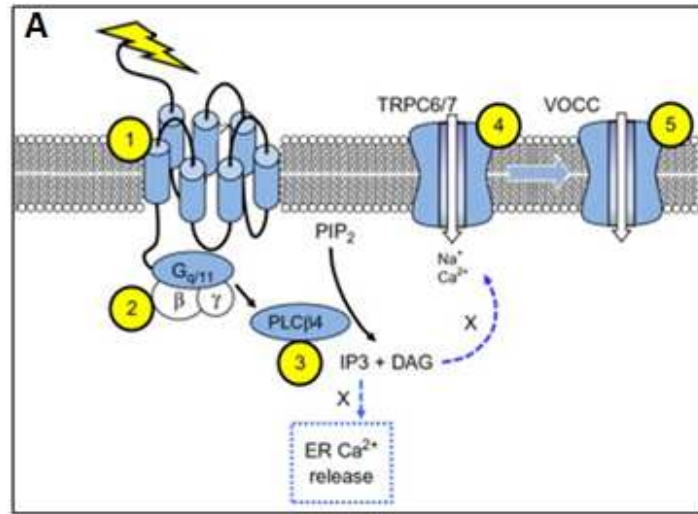


Figure 5 : Organisation et photosensibilité des cellules ganglionnaires à mélanopsine.

(A) Cascade de phototransduction des cellules ganglionnaires à mélanopsine conduisant à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire par l'ouverture de canaux membranaires et par le relargage de calcium par le réticulum endoplasmique.

(B) Organisation et ramification des 5 sous-types de cellules ganglionnaires à mélanopsine.

(D'après : Schimdt et al., 2011)

D. Les dystrophies rétiniennes héréditaires.

1. Généralité et critères de classification

La description du fonctionnement du transit de l'information lumineuse dans la rétine n'est ici qu'un moyen pour mieux comprendre son altération lors de défauts génétiques affectant directement ou indirectement les cellules qui la composent. Le nombre de gènes connus pouvant conduire à une perte totale ou partielle de fonction visuelle est en constante augmentation. On estime aujourd'hui à 291 le nombre de gènes et locus associés à des rétinopathies héréditaires (<https://sph.uth.edu/Retnet>). Près de 15% ne sont pas clairement identifiés et positionnés sur le génome humain. Ce nombre est très probablement sous-estimé comme l'atteste le séquençage d'une cohorte de 82 patients, présentant des symptômes caractéristiques de rétinopathies héréditaires, et dont seulement 60% présentent des mutations dans des gènes déjà identifiés (Zhao et al. 2015). De plus, on découvre en moyenne 30 à 40 nouveaux gènes et locus chaque année et ce rythme se maintient depuis plus de 25 ans (Fig. 6).

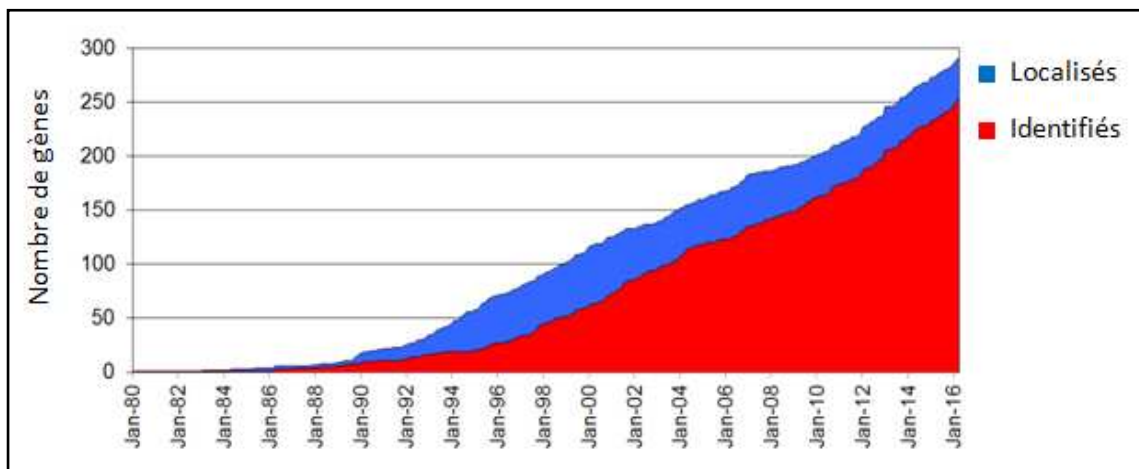


Figure 6 : Evolution du nombre de gènes humains connus pour être impliqués dans des DRH, selon qu'ils soient uniquement identifiés ou bien localisés sur le génome.

(Source : <https://sph.uth.edu/Retnet/sum-dis.htm>)

Le terme de dystrophies rétiniennes héréditaires (DRH) rassemble les différents groupes de maladies congénitales de la rétine dont la prévalence est d'environ 1 individu pour 3500 habitants. Elles sont quasi exclusivement mono-géniques et systématiquement caractérisées par la perte de fonction visuelle très souvent accompagnée par une dégénérescence du tissu rétinien. La plupart des DRH n'affecte que le tissu rétinien: ces maladies sont dites non-syndromiques par opposition aux DRH syndromiques qui affectent d'autres organes simultanément. C'est le cas du syndrome d'Usher qui impacte la vision et l'ouïe ou encore du syndrome de Bardet-Biell lors duquel l'individu présente une altération des fonctions visuelles et une obésité infantile souvent associées à des difficultés d'apprentissage. Au sein des DRH, la vitesse de dégénérescence varie de manière très importante. Ce critère étant discriminant, il n'est pas étonnant qu'il soit à la base de la classification des DRH. Il scinde les maladies selon qu'elles soient dites **progressives** ou **stationnaires**. L'altération des fonctions rétiniennes observable en ERG est aussi prise en considération pour l'établissement de la classification des DRH, selon que la maladie affecte la fonction:

- des cônes seulement (**stationnaire** : achromatopsie ; **progressive** : dystrophie cône)
- des cônes puis des bâtonnets (**progressive** : dystrophie cône - bâtonnet)
- des bâtonnets seulement (**stationnaire** : cécité nocturne congénitale ; **progressive** : dystrophie bâtonnet)
- des bâtonnets puis des cônes (**progressive** : dystrophie bâtonnet -cône, souvent appelée rétinite pigmentaire)

A noter que les maladies dont les fonctions cônes et bâtonnets sont fortement réduites, voire absentes, dès les premières années de la vie, sont couramment désignées comme des amauroses congénitales de Leber. Cette classe, où se trouvent les formes fonctionnellement les plus sévères de DRH, se superpose aux classes précédemment décrites. De même le groupe des dystrophies maculaires se superpose au groupe des dystrophies cônes, où on y ajoute des maladies telles que la rétinopathie juvénile ou la dystrophie maculaire vitelliforme. Malgré toutes ces strates de classification il reste encore de nombreux cas particuliers de DRH, difficilement classable selon la nomenclature décrite ci-dessus, formant donc des sous-groupes à eux seuls, à l'image de la neuropathie optique de Leber.

2. Les étapes caractéristiques d'une dégénérescence rétinienne.

La stratégie thérapeutique que nous mettons en avant dans ce projet ne sera pas dépendante des particularités qui forment les sous-catégories de DRH. C'est au contraire ce qui rassemble les DRH, particulièrement pour les formes progressives, qu'il est intéressant de détailler ici. En effet, il est préférable de voir ces maladies comme un ensemble présentant une chronopathologie stéréotypée

(Marc et al. 2003), comme nous avons pu le constater chez certains de nos modèles canins (Fig. 7), que l'on pourrait résumer ainsi :

- Perte progressive de fonction des bâtonnets et/ou des cônes. Raccourcissement des segments externes et internes des photorécepteurs.
- Perte de fonction totale des photorécepteurs, marquée en premier lieu par la perte des segments externes puis internes, jusqu'à la disparition totale de la cellule.
- Disparition de la couche nucléaire et plexiforme externe.
- Mort d'une partie des cellules bipolaires et amacrines, et donc disparition progressive de la couche nucléaire et plexiforme interne. Délocalisation des cellules survivantes dans la couche de cellules ganglionnaires.
- Remodelage rétinien important accompagné de la délocalisation puis de la disparition de la plupart des cellules ganglionnaires et amacrines.

De par leur vitesse de dégénérescence extrêmement lente, les formes de DRH stationnaires n'aboutiront que rarement à la perte de fonction totale et encore moins à une perte de cellules. Sauf cas particuliers, elles ne représentent donc pas la cible des stratégies thérapeutiques mises en avant dans ce projet. Parmi les DRH progressives, toutes les déficiences n'aboutiront pas non plus à la disparition totale de la rétine. Chaque forme de DRH s'arrêtera à l'un ou l'autre des stades décrits plus tôt. Ce n'est d'ailleurs pas tant que la dégénérescence s'arrête mais plus que la vitesse de progression de la maladie sera telle que le patient n'atteindra jamais certains stades de dégénérescence au cours de sa vie.

Au regard de cette cinétique de dégénérescence, on comprend la raison principale qui nous a poussés à choisir les cellules ganglionnaires comme cible thérapeutique de choix pour traiter des personnes aveugles : leur maintien à long terme (Fig. 7). Si on ajoute à cela que certaines d'entre elles sont capables de répondre intrinsèquement à la lumière, on fait de cette population une cible thérapeutique intéressante pour soigner des malades atteints de DRH à des stades tardifs de dégénérescence. La question suivante est logiquement comment tirer parti de cet avantage de survie et de sensibilité à la lumière pour rendre la vue à des personnes déficientes ? Les cellules ganglionnaires à mélanopsine ne peuvent rendre à elles seules la vue à des personnes aveugles pour deux raisons essentielles : Elles ne représentent que trop peu de cellules, moins de 0,2% des cellules

ganglionnaires totales chez le primate (Dacey et al. 2005), et surtout la très grande majorité d'entre elles ne projettent pas leurs axones vers les corps géniculés latéraux, passage obligatoire vers le cortex visuel. Il faut donc trouver le moyen de rendre les 98% de cellules ganglionnaires traditionnelles, projetant leurs axones vers les corps géniculés latéraux, directement répondeuses à la lumière. Il est vrai aussi que, selon le même raisonnement, on pourrait vouloir réactiver les cellules bipolaires. Elles survivent certes moins longtemps mais cela pourrait suffire pour les DRH qui progressent plus lentement. En suivant la même logique, une stratégie thérapeutique dont le but serait de réactiver les photorécepteurs pourrait paraître encore plus profitable puisque l'on conserverait le réseau rétinien dans son ensemble. À condition de se trouver en présence d'une DRH stationnaire, pour que les photorécepteurs soient encore présents au moment de l'administration du traitement.

Il y a donc un lien fort entre stade de dégénérescence et stratégie thérapeutique. Il est évident que plus le traitement interviendra en amont du traitement de l'information visuelle plus le gain espéré sera grand mais moins il sera universel.

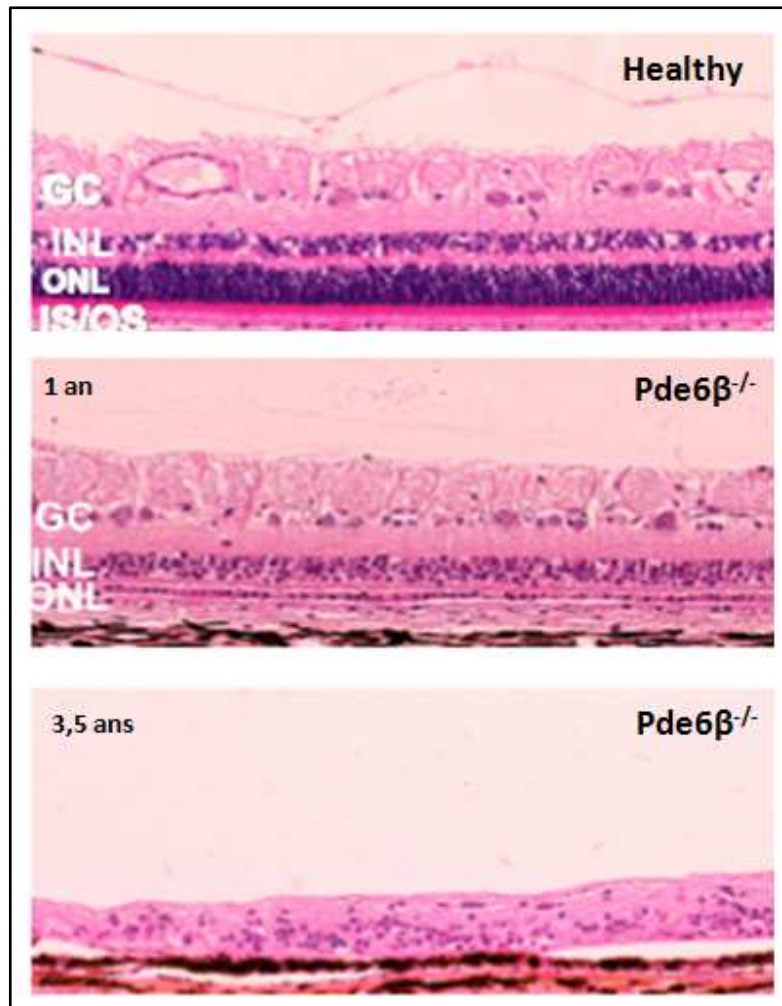


Figure 7 : Evolution progressive de l'épaisseur de la rétine périphérique d'un chien déficient pour le gène Pde6 β , en coupe histologique.

À l'âge d'un an ce modèle canin a déjà perdu l'intégralité de la couche des noyaux des photorécepteurs (ONL) et la couche des noyaux internes (INL), amoindrie, se trouve au contact de l'épithélium pigmentaire rétinien. La couche des cellules ganglionnaires (GCL) semble préservée à ce stade. A 3 ans et demi, la dégénérescence est telle que la couche nucléaire interne a disparu laissant place à une rétine remodelée ne présentant plus de cellule de l'INL ni même de cellule ganglionnaire ou de cellule amacrine. Ne subsistent que des cellules gliales (cellules de Müller) ou des cellules astrocytaires.

(D'après : Pichard et al., 2016)

II. La réactivation des cellules rétiniennes comme traitement des DRH.

Les stratégies de réactivation de la rétine sont multiples et sont logiquement dépendantes de l'origine génétique de la déficience qui influence elle-même la cinétique de dégénérescence. La thérapie génique de remplacement du gène muté par sa version saine semble être la voie logique pour le traitement d'une DRH. Elle n'est cependant pas envisageable dans de nombreuses situations.

A. Les thérapies géniques permettant le maintien ou la restauration des fonctions rétiniennes par l'action naturelle des photorécepteurs.

Ce paragraphe traite des thérapies géniques visant à corriger la déficience en maintenant la rétine dans son fonctionnement normal, autrement dit via une vision basée sur la cascade de phototransduction normale des opsines des cônes et/ou des bâtonnets. Il s'agit des thérapies géniques de correction, d'addition spécifique et non spécifique, à l'exclusion de celles basées sur le transfert d'optogènes qui seront détaillées dans un paragraphe qui leur est dédié (II.C.1)

1. Les vecteurs viraux dérivés du virus adéno-associé.

Le transfert de gènes nécessite l'utilisation de vecteurs capables d'acheminer la cassette d'expression jusqu'au noyau des cellules mammifères. Ces vecteurs peuvent être synthétiques comme le sont les nanoparticules dérivées de liposomes cationiques ou de polyéthylène glycol (PEG) (Zulliger et al. 2015). Particularité notable ; est même considéré comme vecteur non viral l'injection d'ADN nu. Ces vecteurs ont l'avantage de proposer une capacité cargo supérieure aux vecteurs viraux (jusqu'à 14kpb pour les PEG) tout en étant bien tolérés, mais leur efficacité chez l'animal reste encore assez limitée vis-à-vis de leurs "concurrents" d'origine virale. Ainsi le traitement du modèle de LCA rd12 murin basé sur un transfert de gènes via des nanoparticules PEG a permis une restauration partielle des fonctions visuelles pendant 2 ans (Koirala et al. 2013) mais dans des proportions moindres, pour la réponse scotopique, comparé au traitement du même modèle par des vecteurs viraux (Pang et al. 2005). À l'image de cet exemple, les stratégies de thérapie génique dans l'œil reposent principalement sur l'utilisation de vecteurs d'origine virale dont les adénovirus, les lentivirus, et surtout, sur l'utilisation des virus adéno-associés (AAV).

Ce projet de thèse repose exclusivement sur l'utilisation de vecteurs AAV recombinants. L'AAV est un virus non enveloppé à ADN, appartenant à la famille des Parvoviridae, décrit pour la première fois en 1965 (Atchison et al. 1965). Douze sérotypes sauvages ont été découverts (AAV1-> AAV12) mais leur nombre pourrait bien croître avec la recherche d'AAV ancestraux, tel que Anc80, potentiel AAV précurseur des AAV 1, 2, 8 et 9 (Zinn et al. 2015). Chaque sérotype a un tropisme différent selon la nature des protéines qui composent sa capsid. Avec 12 sérotypes, l'AAV offre un panel assez large

de possibilité pour le transfert de gènes dans la rétine puisqu'au moins 7 d'entre eux (AAV2/1, 2, 4, 5, 8, 9 et sh10) sont couramment utilisés en transfert de gènes dans l'œil. Le principal avantage de ce virus en tant que vecteur de thérapie génique, est qu'il n'est pas connu pour être pathogène pour l'Homme! Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas de réponse immunitaire humorale associée à son infection chez l'homme. Environ 80% des personnes infectées par l'AAV de sérotype 2 développent des anticorps circulants, dont seulement 18% s'avèrent être neutralisants (Moskalenko et al. 2000, Calcedo et al. 2009). Mais les réponses cellulaires après injection oculaire sont extrêmement rares et les infections sont asymptomatiques, quel que soit le sérotype concerné. C'est un avantage de taille par rapport aux vecteurs recombinants, en particulier par rapport à l'adénovirus. De plus, le virus adéno-associé a la capacité d'infecter aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en division et il n'intègre que de manière extrêmement rare son génome dans celui de la cellule transduite. Autre particularité de ce virus, il nécessite la présence d'un virus auxiliaire pour démarrer son cycle réplcatif. Ce virus auxiliaire peut être un adénovirus, un herpès virus ou encore le virus de la vaccine. La dépendance de l'AAV vis-à-vis de protéines codées par d'autres virus explique peut-être la taille très contenue de son génome : 4,7kb (Fig. 8). C'est bien moins que les adénovirus (10kb) ou même les lentivirus (11kb) et c'est peut-être le plus gros point faible de ce vecteur. Pourtant ses 4,7kb sont bien exploités car ils mènent à l'expression de 3 protéines de capsid et 4 protéines de réplcation (Fig. 8). Reste que pour la production de vecteurs viraux thérapeutiques, une fois que l'on considère la place prise par les 145 pb des deux séquences d'encapsidation (ITR), le promoteur et la séquence de polyadénylation ; il est quasiment impossible de transférer des séquences nucléotidiques dont la taille excède 4kb. Ainsi, les gènes de taille comprise entre 4kb et 10kb doivent être encapsidés avec d'autres vecteurs viraux. Pour les gènes de taille supérieure il faut trouver une alternative telle que les vecteurs non viraux cités précédemment, mais ce n'est pas la seule alternative possible. Comme développé plus loin dans cette thèse, le transfert d'optogènes peut aussi s'avérer être un choix judicieux dans ce cas de figure, cette stratégie thérapeutique ne nécessitant pas l'apport de la version saine du gène déficient.

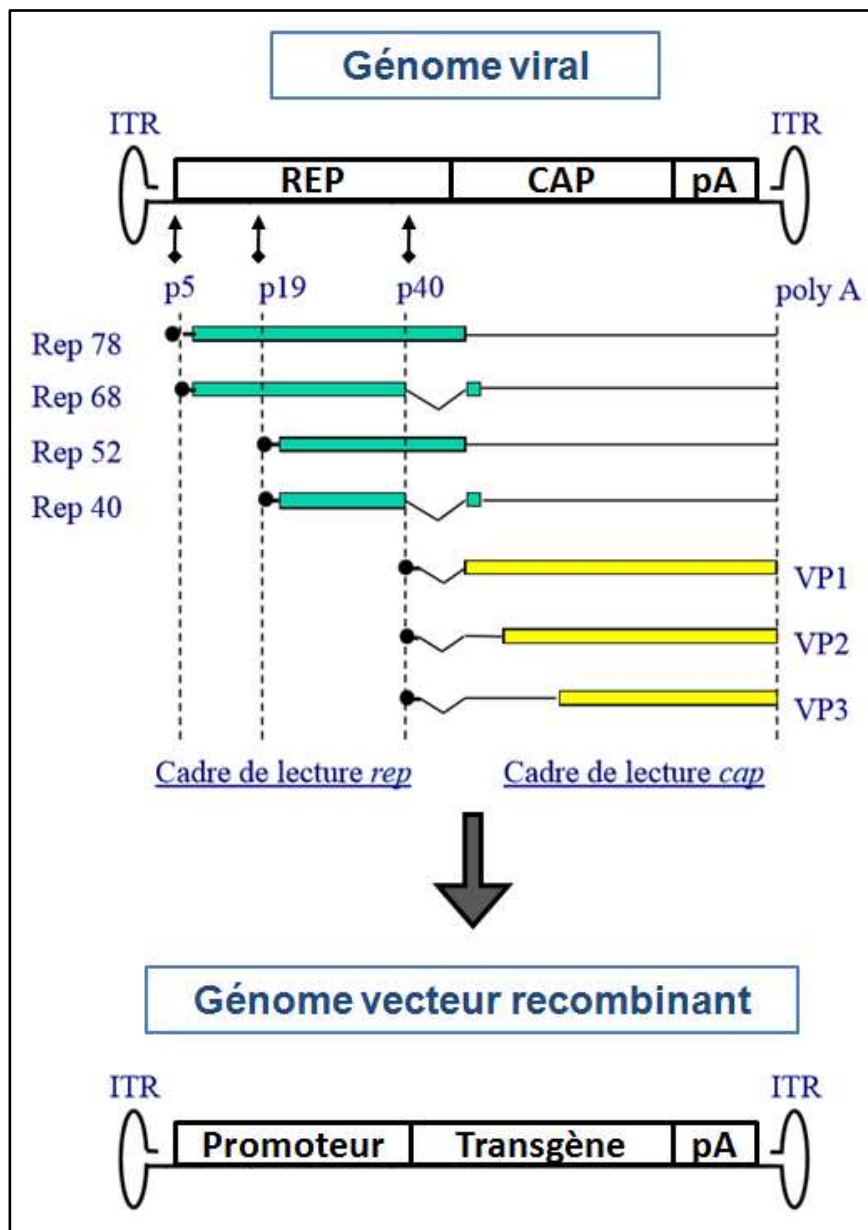


Figure 8 : Transformation du génome sauvage de l'AAV en génome recombinant contenant une cassette d'expression mammifère.

Seules les séquences répétées inversées terminales (ITR) sont conservées pour l'encapsidation. Les gènes REP et CAP sont, eux, remplacés par un promoteur mammifère, un transgène thérapeutique et une séquence de polyadénylation (pA).

2. Les thérapies géniques.

On définit la thérapie génique comme l'apport de matériel génétique pour traiter une maladie. On peut décliner la thérapie génique en au moins trois sous-groupes :

- La thérapie génique de remplacement ou thérapie génique d'addition spécifique. Elle consiste en l'apport de la séquence nucléotidique saine pour compenser le défaut génétique.
- La thérapie génique de correction qui consiste à corriger le défaut génétique au niveau du génome pour permettre l'expression du gène sans la mutation.
- La thérapie génique non spécifique, qui vise à apporter du matériel génétique indépendamment de la mutation génétique.

Quand on parle de thérapie génique de remplacement pour le traitement de dystrophies rétiniennes héréditaires, on pense en premier lieu à l'apport de la version saine du gène muté dans les cellules rétiniennes déficientes, en particulier les photorécepteurs. Cette stratégie thérapeutique a déjà mené aux traitements de modèles rongeurs de DRH mais aussi à des modèles grands animaux diurnes tels que le chien, le cochon ou la chèvre. Ainsi les différents groupes de DRH affectant les photorécepteurs, l'épithélium pigmentaire rétinien ou encore les cellules bipolaires ont pu être traités par thérapie génique de complémentation. C'est le cas, par exemple, du modèle murin rd10 de rétinite pigmentaire (Pang et al. 2008) et de son équivalent canin rcd1 (Petit et al. 2012), du modèle murin rd12 d'amaurose congénitale de Leber (Pang et al. 2005) et de son équivalent canin rpe65^{-/-} (Le Meur et al. 2007), du modèle de dystrophie cône-bâtonnet canin crd1, du modèle murin de cécité nocturne congénitale CSNB1 portant une mutation affectant les cellules bipolaires ON (Scalabrino et al. 2015) et des modèles d'achromatopsie murins GC1ko (Boye et al. (2010) et canins CNGB3 (Komaromy et al. 2010).

La thérapie génique de remplacement, ou thérapie génique d'addition de la version saine du gène muté, a largement fait ses preuves comme stratégie thérapeutique de référence pour le traitement des modèles animaux de DRH. Depuis 2007, la thérapie génique de complémentation est testée chez l'homme avec notamment 5 essais cliniques distincts en cours pour le traitement de l'amaurose congénitale de Leber de type II impliquant le gène Rpe65 (Tab. 1). Tous sont basés sur l'injection de vecteurs viraux rAAV, contenant l'ADNc du gène Rpe65 humain, injecté par voie sous-rétinienne. Trois des cinq études ont conduit à la publication de résultats à au moins 1 an post-injection, jusqu'à plus de 4 ans et demi post-injection pour certaines, concernant près de 39 patients, dont 12 patients en Angleterre à l'université College London (NCT00643747), 15 patients à l'université de

Pennsylvanie (NCT00481546 and NCT00749957) et 12 à l'hôpital pour enfant de Philadelphie (NCT00516477, NCT00999609, and NCT01208389). Les essais israéliens (NCT00821340) et français (NCT01496040), dont le recrutement a démarré plus tardivement, n'ont pas encore publié leurs résultats. En revanche, de nombreuses informations ont pu être tirées des résultats des études américano-britanniques (Petersen-Jones and Komaromy 2015):

1) Aucun effet secondaire sévère indésirable lié au traitement n'a été noté pour l'ensemble de ces premiers essais de thérapie génique dans l'œil.

2) Des améliorations de la sensibilité à la lumière, de l'acuité visuelle ou du réflexe pupillaire ont été rapportées lors de ces trois essais cliniques durant la première année qui a suivi le traitement, associées parfois à un élargissement du champ visuel (Bainbridge et al. 2008, Cideciyan et al. 2009, Melillo et al. 2012).

3) Une amélioration de la sensibilité visuelle a été observée à plus de 6 ans post-injection (Bainbridge et al. 2015, Jacobson et al. 2015). Ainsi qu'un accroissement des zones rétiniennes répondeuses à la lumière durant les trois premières années. Cependant, lors de ces deux études, le gain important en sensibilité remarqué durant la première année, décroît continuellement les années suivantes. De même pour la superficie de la rétine présentant encore une sensibilité à la lumière. Ce qui n'est pas le cas dans l'étude de *Bennett et al.* où les gains observés se sont maintenus durant les trois années suivant l'injection (Bennett et al. 2016).

4) Il n'y a pas de lien évident entre l'âge au moment de l'injection et le bénéfice apporté par le traitement. Dans deux des essais cliniques les gains en vision, sur plus de 3 ans post-injection, n'étaient pas dépendants de l'âge de l'individu au moment de l'administration du traitement (Jacobson et al. 2012). Des résultats différents ont été publiés (Maguire et al. 2009), portant sur une période d'un an post-injection, et où les patients les plus jeunes présentaient un bénéfice plus important. A noter que pour la dernière étude citée, l'acuité visuelle des patients plus âgés a été évaluée dans des conditions lumineuses plus intenses que celles dans lesquelles étaient les patients plus jeunes, or cette différence pourrait expliquer les résultats contradictoires entre ces trois études. En effet, comme le rapportent les membres de l'équipe de *Jacobson et al.*, aux conditions lumineuses utilisées dans l'étude de *Maguire et al.* pour l'évaluation des patients âgés, ils ne détectent de gain d'acuité visuelle chez aucun de leurs patients jeunes ou âgés. Mais si l'expérience est refaite dans des conditions mésotopiques, (comparables à celles utilisées dans l'étude de *Maguire et al.* pour évaluer leurs patients les plus jeunes), alors ils mettent en évidence un bénéfice chez les patients les plus âgés. Ainsi la différence des conditions de luminosité entre les groupes jeune et âgé de l'étude de *Maguire et al.* pourrait expliquer les moins bons résultats

observés chez les patients de plus de 20 ans. Il est donc assez délicat de tirer une conclusion claire de ces trois études concernant le lien entre l'âge d'injection et l'efficacité du traitement puisque le temps post-injection et les tests de mobilité sont différents. Ainsi, et de manière contre-intuitive, on ne peut pas conclure qu'une intervention plus précoce (avant l'adolescence) apporte plus de bénéfice au patient.

5) Contrairement aux résultats observés après thérapie génique de remplacement chez le chien Rpe65^{-/-}, aucune fonction ERG n'est détectable chez les patients traités.

6) Parallèlement aux gains de sensibilité visuelle, le traitement ne permet pas de stopper la dégénérescence rétinienne (Cideciyan et al. 2012, Bainbridge et al. 2015). Un raccourcissement des segments externes et internes des photorécepteurs est observé chez l'ensemble des individus ayant reçu le produit thérapeutique de l'essai basé en Pennsylvanie (NCT00481546 and NCT00749957). L'étude menée par l'équipe de *Cideciyan et al.* met en avant le fait que les résultats observés chez le modèle canin Rpe65^{-/-} ont été obtenus dans des conditions expérimentales particulièrement favorables, ce qui pourrait expliquer le décalage entre le gain obtenu en étude préclinique chez les chiens Rpe65^{-/-} et ces premiers résultats chez l'Homme. En effet la cinétique de dégénérescence lente du modèle canin déficient pour le gène Rpe65 (Mowat et al. 2013, Klein et al. 2014) et l'âge précoce auquel les chiens ont été administrés ne reflète pas les conditions dans lesquelles la plupart des patients se trouvent au moment de l'injection du vecteur thérapeutique (dégénérescence des photorécepteurs déjà établie). Cependant, une étude réalisée l'année suivante et portant sur le traitement de chiens Rpe65^{-/-} plus âgés (2 à 6 ans), quand la perte des photorécepteurs a déjà débuté (Mowat et al. 2013), a démontré qu'il est possible d'avoir une restauration d'ERG ainsi qu'une amélioration des tests de comportement basés sur la vision (Annear et al. 2013). Ainsi dans les conditions actuelles, le traitement du modèle canin Rpe65 ne permet pas d'anticiper ou d'expliquer les résultats obtenus chez l'Homme.

Les essais cliniques se poursuivent maintenant avec pour objectif d'évaluer le bénéfice apporté par l'injection de l'œil controlatéral, dans l'espoir d'observer un effet synergique. Ainsi la poursuite de l'étude (NCT00999609) menée par l'équipe de *Bennett et al.* a conduit 11 des patients déjà injectés sur un première œil, à se voir administrer le même traitement sur l'autre œil, à plus de 2 ans d'intervalle. La publication de cette nouvelle étude de phase 1 (NCT01208389) rapporte : une amélioration de la sensibilité à la lumière sur l'œil controlatéral, 3 ans post-injection, chez 8 patients, ainsi qu'une amélioration de la mobilité pour 10 des 11 patients (Bennett et al. 2016). Cela confirme les bénéfices déjà observés sur le premier œil, sans qu'il n'y ait, là encore, d'effet secondaire sérieux

observé, et malgré la présence d'anticorps circulants dirigés contre l'AAV2 chez un des patients. Enfin, aucun effet synergique n'a été observé sur le premier œil injecté après l'injection du second.

CURRENT HUMAN CLINICAL TRIALS FOR RPE65 GENE THERAPY FROM CLINICALTRIALS.GOV

ClinicalTrials.gov identifier	Date	Title	Phase	Sponsor	Locations
NCT00481546	5/31/2007	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV2-CBSB-hRPE65) Gene Vector to Patients with Retinal Disease Due to RPE65 Mutations (Clinical Trials of Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis)	I	University of Pennsylvania	Shands Children's Hospital, University of Florida, Gainesville, FL, Scheie Eye Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
NCT00516477	8/13/2007	A Phase I Safety Study in Subjects with Leber Congenital Amaurosis (LCA) Using Adeno-Associated Viral Vector to Deliver the Gene for Human RPE65 into the Retinal Pigment Epithelium (RPE) [AAV2-hRPE65v2-101]	I	Spark Therapeutics LLC	The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA
NCT00643747	3/20/2008	An Open-label Dose Escalation Study of an Adeno-associated Virus Vector (AAV2/2-hRPE65p-hRPE65) for Gene Therapy of Severe Early-onset Retinal Degeneration	I/II	University College London	Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust, London, UK
NCT00749957	9/8/2008	A Multiple-Site, Phase I/2, Safety and Efficacy Trial of a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing RPE65 (rAAV2-CB-hRPE65) in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2	I/II	AGTC	University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, Casey Eye Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR
NCT00821340	1/12/2009	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV2-hRPE65) Gene Vector to Patients with Retinal Disease Due to RPE65 Mutations	I	Hadassah Medical Organization	Hadassah Medical Organization, Jerusalem, Israel
NCT00999609	10/21/2009	A Safety and Efficacy Study in Subjects with Leber Congenital Amaurosis (LCA) Using Adeno-Associated Viral Vector to Deliver the Gene for Human RPE65 to the Retinal Pigment Epithelium (RPE) [AAV2-hRPE65v2-301]	III	Spark Therapeutics LLC	University of Iowa, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA
NCT01208389	9/22/2010	A Follow-On Study to Evaluate the Safety of Re-administration of Adeno-Associated Viral Vector Containing the Gene for Human RPE65 [AAV2-hRPE65v2] to the Contralateral Eye in Subjects with Leber Congenital Amaurosis (LCA) Previously Enrolled in a Phase 1 Study	I/II	Spark Therapeutics LLC	The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA
NCT01496040	11/24/2011	Prospective Monocentric Open-Label Non-Randomized Uncontrolled Phase I/II Clinical Gene Therapy Protocol for the Treatment of Retinal Dystrophy Caused by Defects in RPE65	I/II	Nantes University Hospital	CHU Nantes, Nantes, France

Tableau 1 : Résumé de l'ensemble des essais cliniques de thérapie génique visant à traiter l'amaurose congénitale de Leber de type II causée par la déficience du gène Rpe65.

(D'après : Petersen-Jones et al., 2016)

3. L'apport des thérapies géniques d'addition spécifique et de correction pour palier aux limites de la thérapie génique de remplacement.

Il y a de nombreux cas de figure où la thérapie génique de complémentation ne peut pas s'appliquer en l'état:

- Gène de taille supérieure à la limite d'encapsidation de l'AAV.
- Mutation entraînant la production d'une protéine non fonctionnelle et toxique (forme dominante).
- Origine génétique de la maladie, inconnue.
- Perte des cellules cibles de la thérapie génique.

Des stratégies alternatives, toujours basées sur le fonctionnement normal des photorécepteurs, sont envisageables.

a. Les thérapies géniques d'addition spécifique basées sur des couples de vecteurs.

Ainsi dans le cas de gènes de grande taille, l'utilisation de couples ou de triplets de vecteurs dans lesquels sont scindées des fractions chevauchantes de la séquence nucléotidique, peuvent permettre, par recombinaison homologue, de reconstituer un gène entier dans la cellule. Cette stratégie nécessite une double (ou triple) transduction de la même cellule, en plus de l'événement de recombinaison, ce qui limite le nombre de cellules traitées. Reste que la preuve a été faite, suivant cette approche, pour le traitement d'un modèle murin de la maladie de Stargardt (Trapani et al. 2014) et d'un modèle murin rs1 du syndrome d'Usher (Colella et al. 2013, Lopes et al. 2013). Ces événements de recombinaison ont aussi été démontrés chez le porc (Colella et al. 2014) ouvrant ainsi la voie pour la mise en place d'un essai clinique pour le traitement de la maladie de Stargardt, la forme de DRH la plus fréquente.

b. Les thérapies géniques correctives.

Il y a d'autres possibilités pour envisager le traitement d'une mutation pour un gène de grande taille, notamment en corrigeant la séquence nucléotidique directement dans le génome. Ces thérapies géniques de correction ou d'édition de génomes sont rendues possibles par l'utilisation de nucléases à même de cliver l'ADN de manière spécifique. En réponse, la cellule va activer ses systèmes de réparation du génome par recombinaison homologue ou non homologue. Cette stratégie repose donc sur l'utilisation de protéines à doigt de zinc (ZFN), ou d'un activateur de transcription (TALEN)

fusionné à une endonucléase. Mais le système le plus récent et maintenant le plus utilisé en correction de génome repose sur l'utilisation de l'enzyme bactérienne CRISPR/Cas9 qui, par l'intermédiaire d'un ARN guide complémentaire de la séquence nucléotidique mutée, va elle aussi pouvoir cliver. Ce système est plus facile à transposer d'une mutation à une autre car sa spécificité repose sur la séquence de l'ARN guide et pas sur celle de l'enzyme. Tous ces systèmes peuvent servir à engendrer une mutation pour générer de nouveaux modèles animaux, cela est d'ailleurs très couramment utilisé. Dans le cadre d'un traitement, il faut associer ces stratégies avec une séquence d'ADN sain de petite taille et complémentaire de la zone mutée dans le but d'orienter la cellule vers un mécanisme de réparation de l'ADN de type recombinaison homologue. En effet la cellule pourra ainsi se servir de l'ADN sain pour réparer son génome clivé par la CRISPR/Cas9 et ainsi corriger d'elle même sa mutation. Cette approche, qui commence à faire ses preuves *in vitro* sur des cellules souches dérivées de patients, reste assez difficile à transposer *in vivo*. La taille maximale d'encapsidation du vecteur AAV est trop restreinte pour mettre dans la cassette d'expression la CRISPR/Cas9, l'ARN guide et l'ADN sain. Il faut donc envisager une stratégie basée sur un couple de vecteurs (avec les contraintes qui vont avec) ou alors changer de vecteur. Autre écueil, l'événement de réparation du génome par recombinaison homologue *in vivo* est rare. Enfin, dernière interrogation concernant la CRISPR/Cas9 : comment l'inhiber a posteriori ? Car par définition ces trois systèmes sont mutagènes. Ces trois systèmes sont spécifiques d'une séquence nucléotidique, mais ne risquent-ils pas de cliver des zones ciblées dont la séquence pourrait être relativement proche de la séquence cible ? Pour éviter tout risque de survenue de ces événements rares indésirables, il est certain que l'utilisation éventuelle de telles stratégies mutagènes chez l'Homme nécessitera un moyen d'inactiver la Cas9. L'utilisation de vecteurs non viraux inertes (cassette d'expression plasmidique nue), contenant la séquence de la Cas9, de l'ARN guide et éventuellement du brin d'ADN réparateur, pourrait être une solution séduisante puisque l'ADN nu sera rapidement dégradé dans la cellule, limitant ainsi le risque de toxicité à moyen et long terme (Bakondi et al. 2016). Reste toujours la question de l'amélioration de l'efficacité de transduction des vecteurs non viraux.

On évoque ici les thérapies géniques de correction sous l'angle des gènes de grande taille, mais il est bien évident qu'elles pourraient aussi s'appliquer pour des gènes de petite taille. Une première publication vient d'ailleurs de paraître où l'on peut voir que cette stratégie thérapeutique peut conduire à une amélioration des fonctions visuelles, chez un modèle de rongeur de DRH à transmission dominante $RHO^{S334ter}$, dont la mutation est présente sur un gène de petite taille (Bakondi et al. 2016). Cependant, à ma connaissance, aucune preuve de concept de restauration de fonctions visuelles n'a été faite après l'administration de ZFN, TALEN ou CRISPR/cas9 *in vivo* basée sur un mécanisme de recombinaison homologue, limitant les risques de recombinaison génomique

non contrôlée. Ainsi, à cette heure, les thérapies géniques de remplacement restent largement privilégiées si elles sont applicables, et le développement des stratégies de correction reste limité aux autres cas de figure tels que la correction de gènes à transmission dominante. Les formes dominantes de DRH sont souvent caractérisées par l'expression d'une protéine déficiente toxique pour la cellule. La thérapie génique de remplacement, ou thérapie génique d'addition spécifique, bien qu'elle puisse restaurer la fonction biologique perdue, ne permet pas de remédier à la toxicité induite par la protéine mutée. Ainsi la correction du gène pourrait s'avérer une stratégie intéressante malgré les limitations que nous avons évoquées (Bakondi et al. 2016).

c. Les thérapies géniques d'addition basées sur l'utilisation d'ARN interférents.

Il y a une autre alternative, plus utilisée à ce jour que les thérapies géniques correctives, pour stopper l'expression d'une protéine indésirable. Cette alternative repose sur l'action de petits ARN interférents (siRNA), pouvant se lier spécifiquement à un ARN messager et ainsi limiter fortement sa traduction. Cette thérapie génique d'addition doit être utilisée simultanément à une thérapie génique de remplacement pour maximiser la restauration de fonction. De par la taille très contenue des siRNA, 21 à 24 pb, il est possible d'encapsider des gènes de petite taille avec une séquence codant pour un siRNA. L'efficacité de cette approche a été prouvée chez des modèles rongeurs de DRH, tels que le rat P23H dont la surexpression de rhodopsine est délétère (Mao et al. 2012, Ramachandran et al. 2014). A l'inverse, chez un modèle canin de rétinite pigmentaire liée à l'X (X-RPGR) cette double stratégie n'a pas conduit à l'amélioration notable des fonctions ERG, le nombre très faible de chiens dans chaque stratégie thérapeutique nuance la fiabilité des observations (Beltran et al. 2012). Les ARN interférents peuvent être utilisés à d'autres fins que celle d'inhiber l'expression d'une protéine toxique. Ils peuvent être détournés pour travailler de pair avec un promoteur spécifique pour restreindre encore davantage l'expression d'un transgène à un sous-type cellulaire donné. Cette approche a été réalisée avec succès en rajoutant une séquence du miR-240T sur l'UTR3' d'un transgène, permettant ainsi d'étendre l'expression du transgène dans l'EPR suite à une injection intravitréenne avec un AAV2/8 (Manfredi et al. 2013).

d. Les thérapies géniques d'addition non spécifique basées sur des facteurs neuroprotecteurs.

La thérapie génique d'addition peut aussi porter sur l'expression de facteurs de survie, de protéines anti-apoptotiques ou de facteurs de transcription régulant les mécanismes de réponse aux stress oxydatifs pour ralentir la dégénérescence. Cela ne corrigera et ne compensera pas la déficience génétique originelle mais dans le cadre de rétinites pigmentaires à progression lente cela peut permettre la survie des cônes à plus long terme. D'autant plus que, cette approche ne dépend pas

de l'origine génétique de la mutation, elle serait applicable à un grand nombre de patients tant qu'ils présentent des cônes fonctionnels. Ainsi, l'expression de la pro-insuline sécrétée par le muscle a permis le ralentissement de la perte de fonction et de dégénérescence des photorécepteurs aussi bien chez le modèle murin rd10 (Corrochano et al. 2008) que chez le rat P23H (Fernandez-Sanchez et al. 2012). Ces résultats sont en adéquation avec la description des résultats démontrant le rôle de l'insuline dans l'activation du facteur anti-apoptotique mTOR et dans la promotion de la synthèse protéique (Ramachandran et al. 2015, Venkatesh et al. 2015). D'autre part, la sécrétion par les cellules de Müller d'un facteur de survie GDNF (Glial-derived neurotrophic factor) a retardé la perte de fonctions visuelles de rats S334ter, déficient pour le gène RHO, âgés de plus de 5 mois (Dalkara et al. 2011). De même, l'expression de facteurs de survie, tels que le RdCVF, améliore la survie et la fonctionnalité des cônes des modèles rd10 et P23h murins de rétinite pigmentaire (Byrne et al. 2015). Enfin l'expression ectopique du facteur de transduction NFR2 améliore la survie des photorécepteurs chez les modèles murins rd1 et rd10 (Xiong et al. 2015).

Il y a encore beaucoup d'autres facteurs neurotrophiques potentiellement capables de ralentir la progression de la maladie. Ces facteurs de survie, dont beaucoup ne sont pas vectorisés mais directement injectés, peuvent être utilisés en combinaison avec la thérapie génique d'addition ou de remplacement comme cela a été le cas pour le traitement d'un modèle canin CNGB3 d'achromatopsie associé à l'injection de CNTF (Ciliary neurotrophic factor). Ainsi le traitement de ce modèle a conduit à un léger gain sur le maintien de la fonction cône grâce à cette stratégie combinée (Komaromy et al. 2013). Cela a d'ailleurs conduit au lancement d'un essai clinique dont les premiers résultats ne sont hélas pas aussi probants que chez les modèles animaux (pas d'amélioration des fonctions cônes) bien que les patients déclarent ressentir des effets bénéfiques comme une réduction de leurs aversions à la lumière (Zein et al. 2014).

Toutes ces stratégies dépendant du maintien ou de la restauration du fonctionnement naturel des photorécepteurs, ne sont plus envisageables à partir du moment où les cônes et les bâtonnets perdent leurs segments externes photosensibles. Dans ces conditions il faut trouver encore une autre alternative ne reposant plus sur la cascade de phototransduction des photorécepteurs. De fait, comment convertir l'information lumineuse en signaux électriques dans les cellules survivantes de la rétine ?

B. Les différents implants rétiniens.

1. Principe des implants électroniques.

Les implants électroniques ont commencé à être testés chez l'homme dès le début des années 1990 pour réactiver de manière artificielle et temporaire (durant les quelques heures de

l'expérimentation) les cellules de la rétine. L'activation des cellules rétiniennes se fait par l'intermédiaire d'électrodes de stimulation reliées à un générateur qui dépolarise les cellules environnantes. La conversion de la lumière en électricité peut se faire de deux manières différentes : Les prothèses rétiniennes sont dites actives lorsque l'information lumineuse est reçue par un capteur comme une caméra, et que l'information est transmise puis décodée par un processeur (Fig. 9A). Ce processeur choisit donc quelles électrodes se dépolarisent ou non. L'implant rétinien peut aussi être dit passif si l'événement de dépolarisation n'est pas commandé par un processeur mais directement médié par la lumière qui atteint la rétine déficiente. Cela est rendu possible par la présence d'électrophotodiodes (Fig. 9B). Il faut imaginer que l'implant dispose de capteurs lumineux directement au contact de chacune des électrodes du dispositif. Ainsi, si un rayon lumineux est détecté par le capteur, l'électrode émettra une stimulation. Dans les deux cas de figure le générateur est alimenté par une batterie sans fil rechargeable par induction. La durée de vie de ces implants est en théorie limitée par la durée de vie des batteries qui est estimée à une dizaine d'années pour les derniers modèles. Une question subsiste concernant le choix de la population de cellules à dépolariser. Deux cas de figure se présentent selon le mode d'implantation des électrodes. Le placement de la prothèse en position sous-rétinienne pourrait permettre d'atteindre les photorécepteurs ou les cellules bipolaires (selon le stade de dégénérescence) alors que l'implantation en position épitréinienne permettra d'atteindre les cellules ganglionnaires rétiniennes.

a. les implants sous-rétiens.

Dans l'optique d'une implantation sous-rétinienne, ce sont les prothèses électroniques passives qui sont les plus utilisées. Le positionnement de l'électrode entre l'EPR et les cellules survivantes engendre un décollement local de la rétine. C'est une approche périlleuse car la rétine des patients est déjà fragilisée par la dégénérescence. Lors de l'implantation du système le plus avancé d'implant sous-rétinien passif, l'Alpha IMS (Retina Implant AG) (Fig. 9B), un des 19 patients de l'essai a subi un décollement généralisé de la rétine. Malgré cet événement indésirable cette stratégie thérapeutique a deux avantages conséquents vis à vis de ses concurrents épitrétiens : 1) Il n'y a aucune contrainte de synchronisation des mouvements des yeux et des mouvements de la tête. En effet, la stimulation lumineuse se faisant au niveau de la rétine, il y a une adéquation entre la zone regardée et la stimulation. Ce qui n'est pas le cas lorsque l'information est transmise par une caméra située à l'extérieur de l'œil, car on peut très bien bouger les yeux sans bouger la tête ou inversement. Auquel cas l'information transmise et donc la stimulation électrique, n'est pas en phase avec l'orientation des yeux et la zone où se porte le regard. Il faut donc, pour les implants utilisant des caméras, accompagner d'un mouvement de tête tout mouvement des yeux : pas très pratique ! 2) Deuxième avantage, grâce au rechargement par induction et en l'absence de caméra, le système Alpha IMS est

totallement clos. Les risques d'infection ou d'hypotonie sont largement diminués vis à vis à des concurrents où l'image de la caméra analysée par le processeur est transmise par câble jusqu'aux électrodes. A noter que l'Alpha IMS est un système constitué de 1500 électrodes réparties sur 3m², c'est le système qui comporte à ce jour le plus d'électrodes.

En termes de résultats, cette stratégie thérapeutique a fait preuve de son efficacité en essai chez l'homme. Sur les 9 derniers patients ayant reçu la prothèse Alpha IMS, 8 étaient capables de percevoir une stimulation lumineuse ou d'identifier des objets sur une table, 4 d'entre eux pouvaient même reconnaître les lettres de l'alphabet (Weiland and Humayun 2014). A noter que 3 des 19 implants ont présenté des défauts d'étanchéités au bout de 250 jours. Malgré cela, de très bons résultats ont permis d'obtenir le label CE de conformité de la part de l'union européenne en vue d'une autorisation de mise sur le marché.

b. Les implants épirétiniens.

Les implants épirétiniens sont des prothèses actives capables de stimuler les cellules ganglionnaires rétiniennes. Le système le plus avancé sur le marché, qui entre en phase de commercialisation en Europe et aux Etats-Unis, est le système Argus II (Second Sight) (Fig. 9A). Il est composé de 60 électrodes, de 200um de diamètre chacune, disposées en quadrillage 6x10 sur une surface de 3 mm². Il a été testé en essai clinique chez l'Homme entre 2007 et 2009 chez 28 patients. La perception lumineuse se fait au niveau d'une caméra située sur une des branches des lunettes portées par le malade. Le processeur qui traite les informations transférées par la caméra peut commander l'activation d'une ou plusieurs électrodes à la fois, selon les différents motifs lumineux fournis. Cette transmission se fait par câble ce qui a déjà posé des problèmes d'infection ou de baisse de pression oculaire. De plus, comme évoqué dans le chapitre précédent, les mouvements de la tête doivent être en adéquation avec les mouvements de l'œil pour que les informations perçues par la caméra correspondent à la zone regardée. Mais l'argus II a d'autres avantages à faire valoir : l'externalisation du processeur le rend accessible et il peut donc être amélioré et modifié au cours du temps selon les avancées technologiques. Et malgré son nombre plus faible d'électrodes, les résultats obtenus chez l'homme sont tout aussi spectaculaires que ceux obtenus avec l'Alpha IMS. Ainsi l'ensemble des personnes implantées ont retrouvé une perception lumineuse corrélée aux stimulations. 27 des 28 participants ont été capables de détecter la présence d'objets, et parmi eux 6 ont pu différencier un objet en mouvement d'un objet statique (Weiland and Humayun 2014). Enfin 6 patients ont pu reconnaître n'importe quelle lettre de l'alphabet qu'il leur a été présentée, avec un taux de succès de 64% (contre 10% lorsque l'appareillage est éteint).

2. Les pistes d'amélioration et les limites des implants rétiniens.

Les nouveaux prototypes de prothèses rétiniennes actives proposent de placer une micro caméra dans l'œil, sur le chemin de la lumière, au niveau du vitrée, pour ainsi disposer d'un système clos et capable de suivre les mouvements de l'œil (Fig. 9C). Les autres pistes d'amélioration des systèmes actifs sont logiquement l'augmentation du nombre d'électrodes et de la surface recouverte par l'implant pour l'amélioration de la résolution et de la largeur du champ visuel restauré. Le problème commun à toutes ces améliorations est l'insertion d'un dispositif de "grande" taille dans l'œil. La sclérotomie ne devant pas dépasser les 5mm, des dispositifs dépliés une fois dans l'œil (dans la cavité vitrée) sont étudiés et pourraient permettre de couvrir plus de 30° du champ visuel contre moins de 10° actuellement (Ameri et al. 2009).

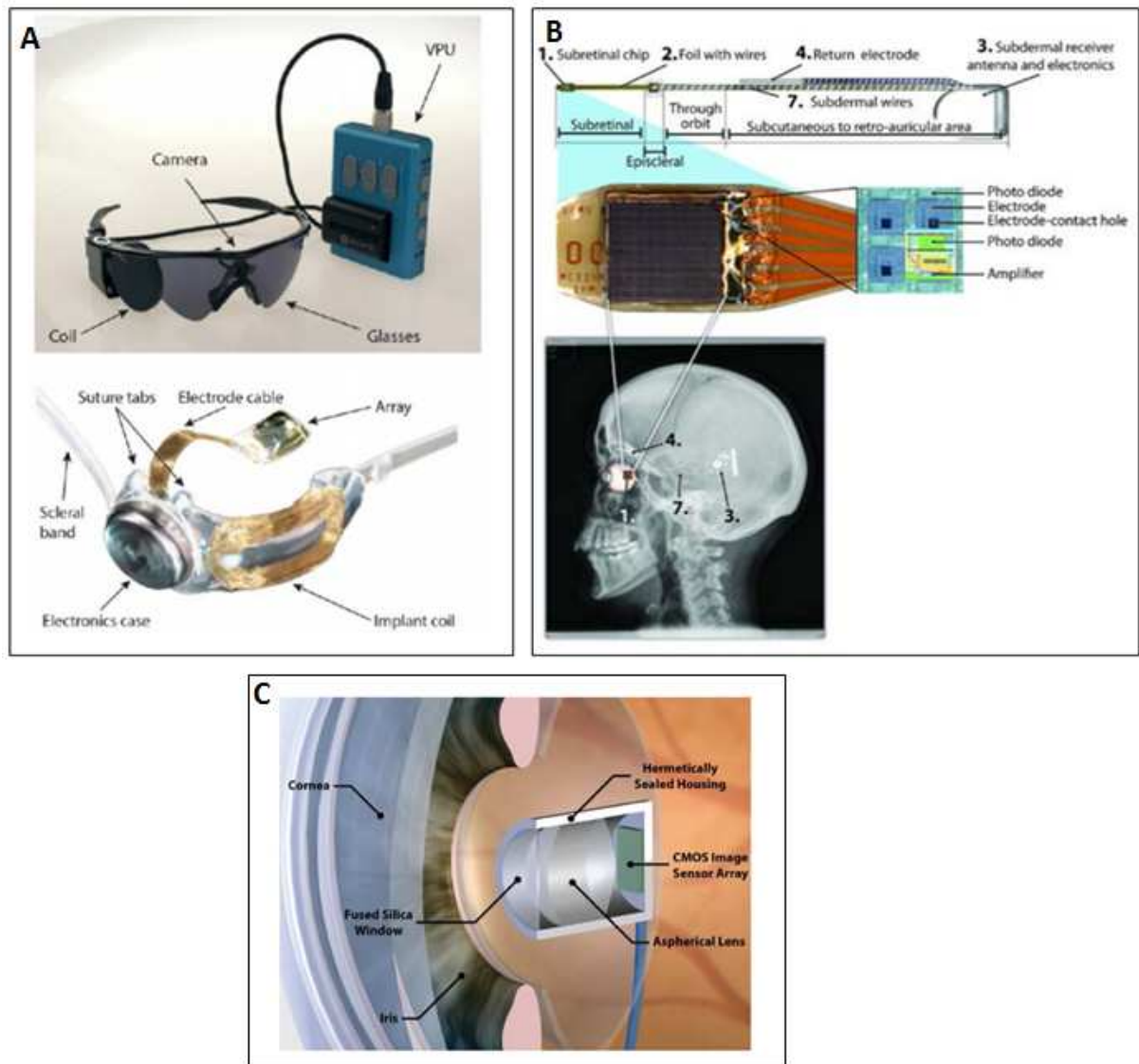
Dans la course à l'élargissement des implants, les prothèses sous-rétiniennes sont toujours limitées par un même problème : le décollement rétinien. Il n'est pas envisageable d'utiliser des implants dépliés de 10 mm² qui risqueraient d'empêcher un recollement de rétine. L'essor des implants sous-rétiniens risque de s'arrêter là, peut-être remplacés par des implants suprachoroïdiens dont l'attache se ferait entre la sclère et la choroïde. Cela limiterait grandement les dommages à la rétine car seules les électrodes se prolongeraient en direction des couches rétiniennes externes. L'autre avantage de cette stratégie récente est la meilleure dissipation de la chaleur par les nombreux vaisseaux sanguins environnants (Yue et al. 2016). Cette stratégie n'a pas encore été testée chez l'Homme et nous avons donc peu de recul sur le potentiel bénéfique de cette nouvelle forme d'implant.

D'autres contraintes et interrogations d'ordre biologique, et non plus technique, entourent l'utilisation des prothèses rétiniennes, qu'elles soient passives ou actives, sous-rétiniennes, épitrétiennes ou suprachoroïdiennes. Comment le cerveau interprète-t-il ces dépolarisations anarchiques et artificielles? Sous-entendu comment le microprocesseur doit-il choisir quelles électrodes doivent être activées pour coder au mieux l'information ? Il a été montré qu'à peine la moitié des électrodes (55%) de l'Argus II engendrent une sensation, de type phosphène, chez les patients. Pour l'Alpha IMS, plusieurs électrophotodiodes doivent être activées simultanément pour induire une perception chez l'individu. Ce ne sont que deux exemples parmi plusieurs, ce qui montre qu'on ne sait pas expliquer la perception lumineuse rendue aux patients implantés. Pas plus qu'on ne peut anticiper quelles cellules sont stimulées par les dépolarisations des électrodes. Il est presque certain que la dépolarisation d'une électrode de 200µm de diamètre, comme celles de l'Argus II, dépolarise plusieurs cellules ganglionnaires et amacriennes au même moment. Pour limiter la stimulation à une cellule, des électrodes de nouvelle génération d'un diamètre inférieur à 15µm sont

nécessaires (Sekirnjak et al. 2008). De plus, il est très probable qu'un même signal soit transmis à des cellules ganglionnaires à centre ON et à centre OFF. L'étude d'un sous-type de cellules ganglionnaires (cellules parasols) chez le primate démontre que les seuils d'activation des cellules ganglionnaires parasols ON et des cellules ganglionnaires parasols OFF se chevauchent. Cela empêche d'agir sur l'intensité de la dépolarisation pour stimuler spécifiquement l'un des deux systèmes (ON ou OFF) (Sekirnjak et al. 2008). La recherche d'un moyen de stimuler sélectivement et alternativement les systèmes ON et OFF, au niveau des cellules ganglionnaires ou des cellules bipolaires, est d'un enjeu crucial pour espérer restaurer une vision contrastée. Beaucoup de recherches sont maintenant menées, non plus sur l'intensité de stimulation, mais sur les fréquences de stimulation (200 - 2000Hz) (Cai et al. 2011, Twyford et al. 2014) ou sur l'utilisation de courants diphasiques pour spécifiquement activer le système ON/OFF. Cela a d'ailleurs été démontré *ex vivo* sur des rétines de lapin analysées par puce MEA (micro électrodes en ligne) (Werginz et al. 2015). Comme le rappellent les auteurs de ces publications, les conclusions tirées de ces expériences *ex vivo* ne prennent en considération que la réponse d'une seule population rétinienne (celle étudiée) et non celle de l'intégralité du réseau. Le rôle régulateur des cellules amacrines n'est par exemple pas pris en considération.

Malgré les nombreuses interrogations que peut soulever l'utilisation de ces prothèses rétiniennes, les résultats prouvent que le cerveau est capable d'interpréter ces signaux artificiels voire parfois même probablement antagonistes. On ne peut pas vraiment parler de vision restaurée chez les individus implantés car le ressenti n'est semble-t-il pas visuel mais se traduit plutôt par un ensemble de phosphènes. Reste qu'après un certain temps d'apprentissage, les patients peuvent apprendre à associer ces sensations à des images et des formes caractéristiques. La dernière grande question concernant les implants que je veux soulever ici est celle qui a permis de justifier le développement du transfert d'optogènes : Comment rendre une perception lumineuse résolutive avec un nombre d'électrodes aussi limité, au vu du nombre de cellules rétiniennes répondeuses chez un individu sain ? Si 60 électrodes sont capables de rendre une perception lumineuse à des personnes aveugles qu'en serait-il si on parvenait à réactiver artificiellement par thérapie génique d'addition des millions de cellules rétiniennes survivantes ?

La question de l'amélioration de la résolution est au cœur du développement de la thérapie génique optogénétique qui s'est longtemps reposée sur la preuve du fonctionnement des implants pour justifier sa crédibilité.



Weiland and Humayun

Figure 9 : Différents types d'implants rétiniens.

(A) Modèle Argus II, prothèse passive épirétinienne.

(B) Modèle Alpha-IMS, prothèse active sous-rétinienne.

(C) Prototype de prothèse active épirétinienne permettant de suivre les mouvements de l'œil, combinée à une transmission d'informations sans fil.

(D'après : Weiland et Humayun, 2014)

C. Le transfert d'optogènes selon le stade de dégénérescence.

1. Principe du transfert d'optogènes.

Les résultats obtenus avec les implants rétiniens, et cette question centrale de l'amélioration de la résolution, sont à la base du développement du transfert d'optogènes. Le constat initial est simple : Les implants ont prouvé que dépolairiser directement des cellules ganglionnaires, normalement insensibles à la lumière, peut conduire à la transmission de signaux interprétables par le cerveau. Le transfert d'optogènes a été pensé comme une stratégie alternative aux implants rétiniens, permettant de passer d'une résolution limitée par un nombre restreint d'électrodes (maximum 1500 électrodes sur 3mm^2), à une résolution de millions de cellules bipolaires ou ganglionnaires réparties sur l'ensemble de la rétine. Avec cette approche, on n'utilise plus d'électrode pour dépolairiser les cellules cibles, mais à la place, on apporte un gène qui conduit à l'expression d'une protéine sensible à la lumière, un optogène, et dont l'action engendre une variation du potentiel de membrane dans la cellule cible. C'est le principe du transfert d'optogènes (Fig. 10). Plus besoin ici d'un microprocesseur et d'une caméra, le système est totalement autonome car c'est bien la lumière qui traverse naturellement l'œil qui déclenche la réponse des cellules, via la présence d'optogènes à leur surface.

La plupart des avantages des implants rétiniens demeure avec le transfert d'optogènes. Cette stratégie thérapeutique est par définition indépendante de l'origine des mutations. Ainsi le transfert d'optogènes peut s'appliquer pour toute déficience d'une population cellulaire localisée en amont des cellules cibles, dans le processus de transmission de l'information lumineuse. Autrement dit, si on cible les cellules ganglionnaires comme c'est le cas dans ce projet de thèse, il est en théorie possible de traiter toute personne affectée par un ou plusieurs défaut(s) génétique(s) localisé(s) dans : l'épithélium pigmentaire rétinien, les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires ou même les cellules amacrines. Il n'est en théorie même pas nécessaire de savoir quel(s) gène(s) est (sont) muté(s) ni même quelle est la fonction biologique altérée. Le choix des cellules ganglionnaires comme cibles, de par leur survie à long terme, est d'autant plus intéressant qu'il élargit la fenêtre thérapeutique à des malades à des stades avancés, qui ne seraient plus éligibles avec les autres stratégies de thérapies géniques.

Cependant, il est pour l'instant fantaisiste de penser que le transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires se substituera à la thérapie génique de remplacement, dans les cas où cette dernière est applicable. En effet, comme pour les implants rétiniens, cette stratégie ne permet pas à ce stade de conserver le système ON/OFF de contraste, ou les autres moyens de modulation de l'information lumineuse par les cellules horizontales ou amacrines. De plus, les cellules ganglionnaires converties en cellules directement répondeuses à la lumière par l'action d'une protéine, n'auraient pas de

cascade de phototransduction permettant de moduler finement les réponses à la lumière. L'attente, vis à vis de la qualité de la vision rendue, n'est ainsi pas le même que pour une stratégie de thérapie génique où le réseau rétinien est maintenu. Le transfert d'optogènes doit être vu comme une stratégie alternative pour les cas où la thérapie génique n'est pas envisageable (gène déficient inconnu, stade avancé de dégénérescence, origine multigénique, gène déficient de très grande taille).

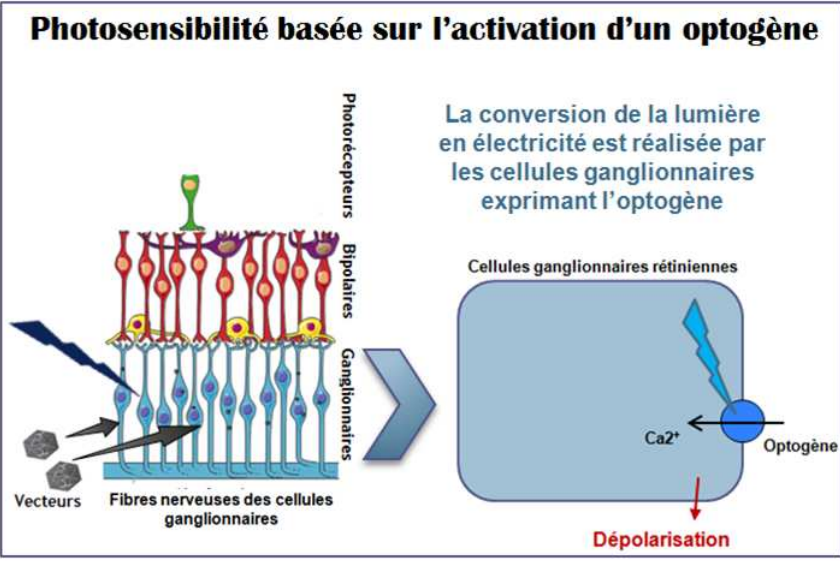
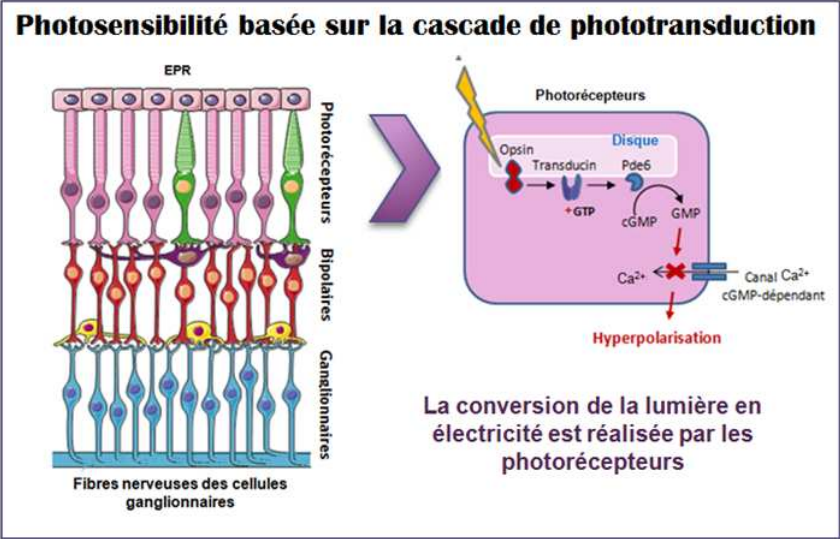


Figure 10 : Comparaison des mécanismes de photosensibilité entre la cascade de phototransduction des photorécepteurs et la réactivation des cellules ganglionnaires après la stimulation d'un optogène.

2. Mode d'action et propriétés des optogènes Opn4, ChR2 et eNpHR.

La clef de voûte du système du transfert d'optogènes est par définition l'optogène lui-même. Ce gène code généralement pour un canal ou une pompe sensible à la lumière. Le système de conversion de la lumière en électricité est donc réduit à son minimum : une unique protéine codée par un seul gène, avec l'avantage d'être facilement vectorisable. Le revers de la médaille est l'absence d'amplification du signal. Au niveau des photorécepteurs, l'excitation d'une opsine par un photon conduit à l'ouverture de nombreux canaux ioniques. Ici ce ne sera pas le cas, une stimulation d'un optogène conduira à l'ouverture d'un seul canal. Le corolaire est qu'il faudra une source importante de lumière pour activer de nombreux canaux au même moment et ainsi permettre de modifier sensiblement le potentiel de membrane de la cellule pour que le signal lumineux se propage. L'optogène channelrhodopsine-2 (ChR2) et l'optogène halorhodopsine (eNpHR) sont respectivement un canal et une pompe utilisés en transfert d'optogènes dans le cadre de traitement de DRH (Fig. 11). L'avantage d'avoir différents optogènes, provenant d'organismes extrêmement éloignés, est que l'on va pouvoir tester les différentes propriétés de chacun comme outil thérapeutique. En effet, tous les optogènes ne répondent pas aux mêmes longueurs d'onde et n'induisent pas la même variation de polarisation. Leur temps de latence entre deux stimulations ou encore la quantité de lumière pour obtenir une réponse sont autant de variables qui font qu'il est difficile de prévoir à l'avance quel optogène sera le plus adapté à une restauration de vision. Sans compter que de nombreuses équipes de recherche modifient la séquence nucléotidique de ces gènes pour en modifier les propriétés (Kleinlogel et al. 2011, Klapoetke et al. 2014). Il existe ainsi près d'une dizaine de variants ou d'homologues de la channelrhodopsine dont les propriétés, notamment d'absorbance, n'ont plus rien à voir avec celles décrites dans notre étude (Schneider et al. 2015).

Reste que, bien que ce soit majoritairement le cas, les optogènes ne sont pas tous des canaux ou des pompes. Un optogène peut aussi coder pour une protéine transmembranaire sensible à la lumière qui recrutera un second messenger pour activer une cascade de signalisation/d'amplification aboutissant à l'ouverture ou à la fermeture de canaux ioniques (Fig. 11). C'est exactement ce qui se passe avec les opsines. En ce sens, les opsines peuvent être vues comme des optogènes. Néanmoins ce système nécessite l'intervention de nombreux gènes, ce qui le rend difficilement vectorisable. Il faut donc que la population de cellules cibles du transfert d'optogènes dispose déjà d'une cascade sur laquelle l'optogène se greffera. Deuxième limite avec l'utilisation d'opsines comme optogène : elles ont besoin du cycle visuel pour recycler leurs pigments photosensibles. Mais cette contrainte ne vaut que pour les opsines des photorécepteurs. Ainsi on en revient au cas très intéressant des cellules ganglionnaires à mélanopsine. La mélanopsine ne nécessite pas d'être recyclée par le cycle visuel, pour être de nouveau excitable. On sait aussi qu'au moins une partie des cellules

ganglionnaires (les cellules ganglionnaires à mélanopsine) dispose d'une cascade d'amplification aboutissant à l'ouverture de canaux calciques (Lin et al. 2008). Cela fait des cellules ganglionnaires une cible très intéressante pour un transfert d'optogènes basé sur le gène *Opn4* codant pour la mélanopsine.

Les autres optogènes tels que ChR2 et eNpHR sont tout aussi applicables au transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires que le gène *Opn4*. Par contre l'optogène *Opn4* aura l'avantage d'être un gène d'origine mammifère alors que les deux autres proviennent respectivement d'algues et de bactéries, et soulèvent donc légitimement plus d'interrogation quant à leur potentielle innocuité. Mais ChR2 et eNpHR ont d'autres avantages et notamment leur temps de réponse beaucoup plus rapide et plus proche des temps de réponse physiologiques des opsines des photorécepteurs. Cette impossibilité à déterminer de manière rationnelle quel serait le meilleur candidat nous a conduits à étudier en parallèle l'effet du transfert d'optogènes de chacun de ces trois gènes dans les cellules ganglionnaires.

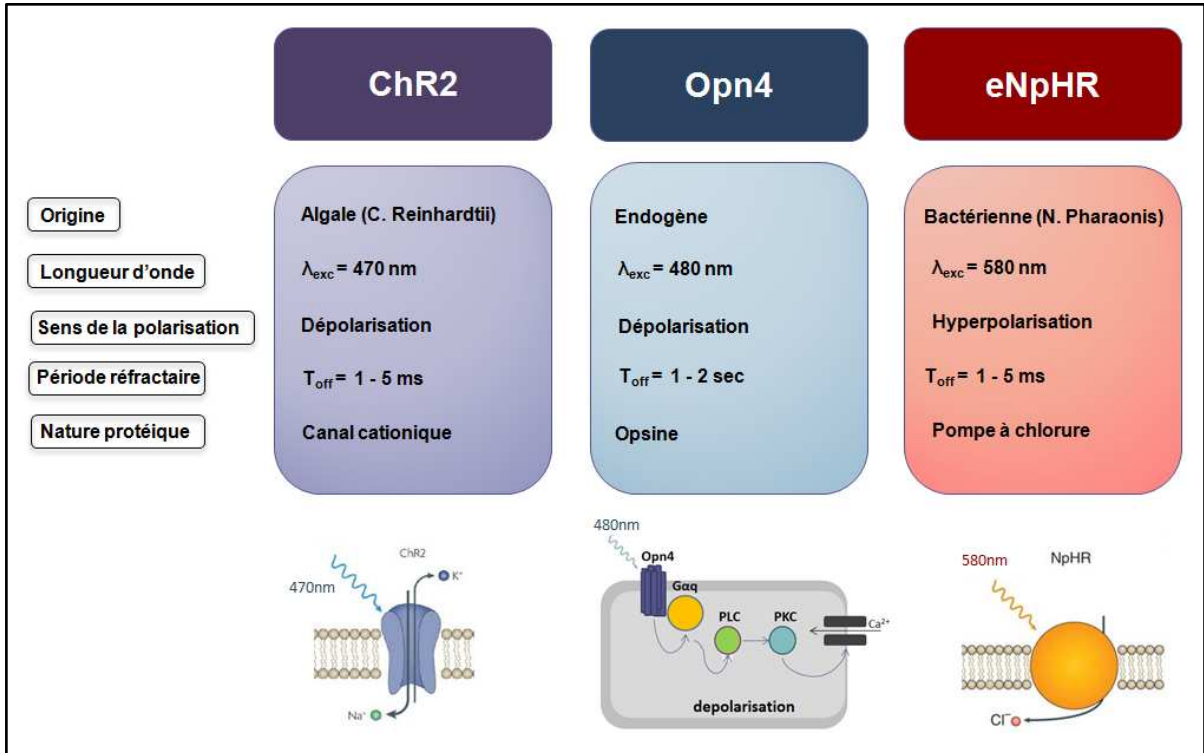


Figure 11 : Comparaison des propriétés des optogènes channelrhodopsine (ChR2), mélanopsine (Opn4) et halorhodopsine (eNpHR).

3. Traitement de modèles rongeurs de DRH.

Les trois optogènes que nous souhaitons tester ne sont pas simplement de bons candidats sur le papier, ils ont aussi été utilisés avec succès en transfert d'optogènes chez différents modèles rongeurs déficients visuels en réactivant soit les photorécepteurs, soit les cellules bipolaires ou soit les cellules ganglionnaires rétiniennes. L'intérêt de cibler d'autres populations cellulaires est directement lié à la chronopathologie des DRH que nous avons schématisée précédemment (Fig. 7). Selon le stade d'avancement de la dégénérescence, les potentielles cibles d'un transfert d'optogènes varient (Sahel and Roska 2013). Il apparaît évident qu'en fonction du stade de dégénérescence, les populations de cellules survivantes ne sont pas les mêmes et donc les cibles potentielles d'un transfert d'optogènes différent (Fig. 12). La question est de savoir quels pourraient être les avantages de cibler une population plutôt qu'une autre. Sachant que les cellules impliquées dans le transit de l'information lumineuse survivant le plus longtemps sont les cellules ganglionnaires, y a-t-il un intérêt à vouloir cibler les cellules bipolaires ou photoréceptrices si ces dernières sont encore présentes ?

a. Transfert d'optogènes dans les cônes dormants.

A un stade précoce de dégénérescence mais après la perte de fonctionnalité rétinienne, les photorécepteurs cônes notamment, peuvent subsister plusieurs années. On le remarque principalement pour des formes particulières de DRH : les rétinites pigmentaires. Ces cônes survivants sont appelés "cônes dormants" car leur corps cellulaire subsiste malgré la perte de leur segment externe naturellement photosensible. A ce stade, les stratégies de thérapies géniques de remplacement et de correction ciblant les photorécepteurs semblent difficilement envisageables (l'ensemble du processus de phototransduction étant perdu) et les stratégies de neuroprotection inappropriées car il n'y aurait plus de fonctionnalité à maintenir. Mais la réactivation de ces cônes par l'apport d'optogènes paraît possible. L'avantage ici serait la conservation du réseau rétinien et donc un potentiel gain quant à la vision rendue. En effet si la protéine codée par l'optogène induisait un effet hyperpolarisant dans les photorécepteurs alors il serait possible de reproduire la réponse électrique de la cascade de phototransduction naturelle. De plus, si les cônes survivants étaient en mesure de s'hyperpolariser à la lumière alors ils sécrèteraient des neurotransmetteurs activant aussi bien les bipolaires ON que OFF suivant le mode d'action habituel. On comprend ainsi qu'en ciblant les cellules photoréceptrices par transfert d'optogènes on peut espérer maintenir le système de contraste ON/OFF. C'est un énorme avantage par rapport aux implants rétiniens, qu'ils soient épirétiniens ou sous-rétiniens ! Le gain en terme de qualité de vision pourrait être décuplé.

Toute la question ici est de réussir à intervenir à ce stade de dégénérescence bien précis. Cela sous-entend une connaissance fine de la chronopathologie selon la forme de DRH et l'avancement de la

maladie chez le patient. Car peu de temps avant ce stade, certains cônes sont encore fonctionnels et c'est donc une approche de neuroprotection ou de thérapie génique de remplacement/correction qui sera privilégiée. Combien de temps dure la fenêtre thérapeutique entre la perte de fonction des derniers cônes et la disparition totale de leur corps cellulaire ? Impossible à prédire, seule une bonne connaissance du développement de chaque pathologie dans le temps permettra de répondre à cette question et donc de savoir si une approche de transfert d'optogènes dans les cônes dormants est pertinente. La réponse est donc au cas par cas. Cette question de la fenêtre thérapeutique disparaît quand on transpose cette approche pour faire une preuve de concept chez des rongeurs dont la progression de la maladie est bien caractérisée. Ainsi, la preuve a été faite quant à la possibilité de réactiver les cônes dormants par transfert de l'optogène eNpHR chez deux modèles différents de DRH : la souris double déficiente $Rho^{-/-}$ $Gnga3^{-/-}$ et la souris rd10 déficiente pour le gène $Pde6b^{-/-}$ (Busskamp et al. 2010). La réussite de la réactivation de photorécepteurs chez deux modèles différents, l'un à dégénérescence lente et l'autre à dégénérescence rapide, est une preuve de l'universalité du transfert d'optogènes, par opposition aux thérapies géniques de remplacement ou de correction. Autre point marquant de cette étude, la preuve par des analyses de patch clamp *ex vivo* que les cellules ganglionnaires conservent bien une réponse physiologique suivant leurs orientations ON/OFF respectives.

Le transfert d'optogènes dans les cônes dormants pourrait aussi être possible à un stade plus précoce en cas de perte complète des fonctions visuelles mais en absence totale de dégénérescence rétinienne. Cela serait cependant un cas de figure assez rare puisqu'une stratégie de thérapie génique de remplacement du gène déficient serait largement privilégiée comparée à une approche de transfert d'optogènes (Sahel and Roska 2013). Si toutefois aucune des stratégies de thérapies géniques décrites dans le chapitre II.A.3 n'étaient applicables alors un transfert d'optogènes dans les photorécepteurs pourrait être une alternative envisageable.

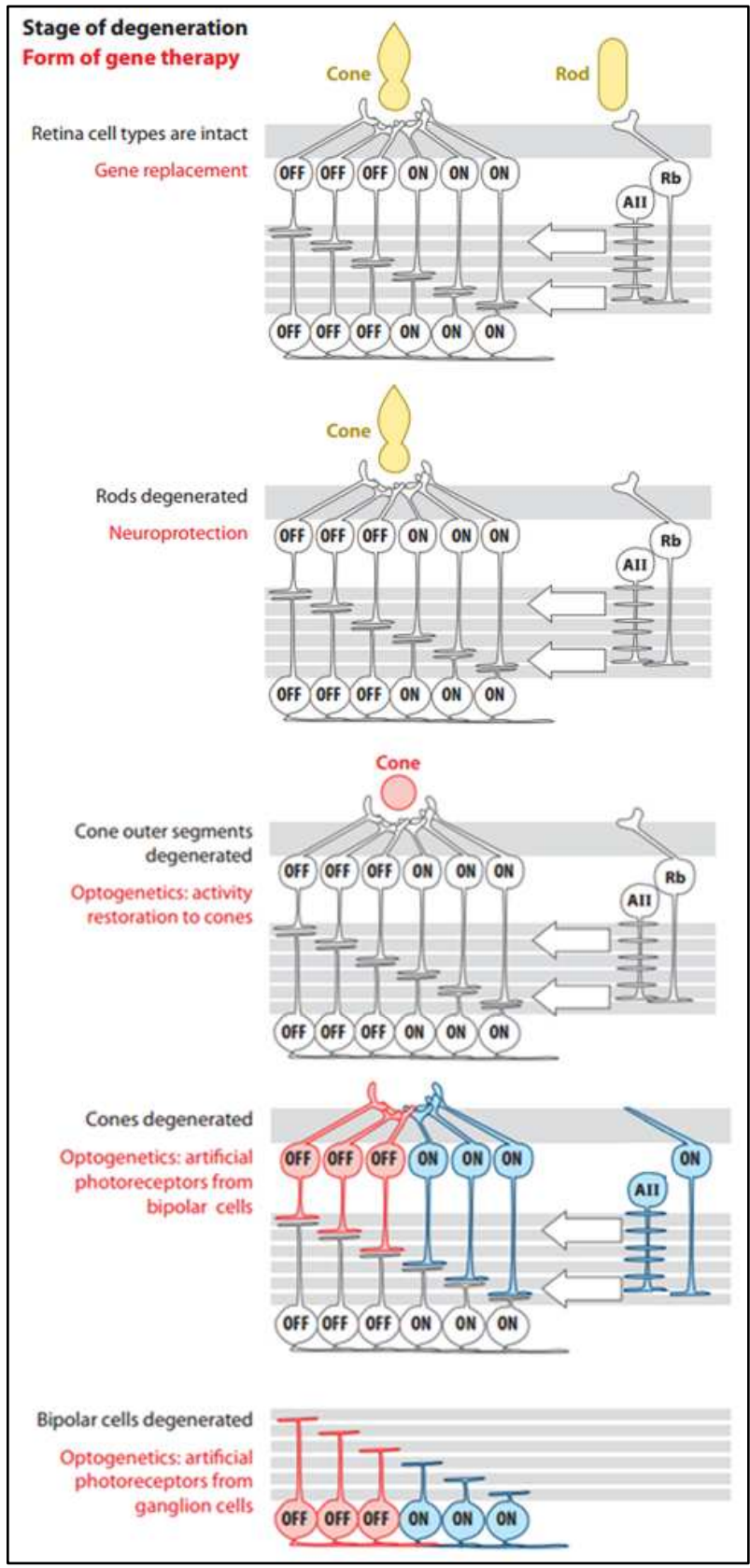


Figure 12: Les stratégies de thérapie génique envisageables selon le stade de dégénérescence. (D'après : José-Sahel et Roska, 2013)

b. Par transfert d'optogènes dans les cellules bipolaires ON.

A un stade plus avancé de la dégénérescence, quand les cellules photoréceptrices ont totalement disparu mais que la couche nucléaire interne est encore présente, il est envisageable de cibler par transfert d'optogènes la population de cellules bipolaires. Pour conserver le fonctionnement du système ON/OFF, il faudrait dans l'idéal apporter des optogènes dépolarisants dans les bipolaires ON et des optogènes hyperpolarisants dans les bipolaires OFF. Dans les faits ce n'est pas aussi simple. On peut effectivement, restreindre l'expression d'un optogène aux cellules bipolaires ON, notamment grâce à l'utilisation de séquences régulatrices amplificatrices (enhancer) spécifiques de cette sous-population telles que l'enhancer du gène murin GluR6 (Cronin et al. 2014). Ainsi on peut permettre aux cellules bipolaires ON de répondre à une augmentation de lumière par une dépolarisation, comme elles le font naturellement dans un contexte sain. Il faut pour cela utiliser un optogène dont les propriétés conduisent à une dépolarisation suite à une activation à la lumière : c'est le cas des optogènes ChR2 ou Opn4, pour n'en citer que deux. Par contre, ne disposant pas de promoteur ou de séquence régulatrice spécifique aux cellules bipolaires OFF, on ne peut pas à l'heure actuelle envisager le transfert d'un optogène hyperpolarisant, comme eNpHR, dans cette sous-population OFF. Mais cela n'a pas empêché de nombreuses équipes de prouver que le transfert d'optogènes dans les cellules bipolaires ON uniquement, permet de restaurer des fonctions rétiniennes, corticales et même visuelles chez différents modèles rongeurs de DRH (Lagali et al. 2008, Doroudchi et al. 2011, Cronin et al. 2014, Gaub et al. 2014, Cehajic-Kapetanovic et al. 2015, Gaub et al. 2015, van Wyk et al. 2015). Bien que le modèle murin rd1 de rétinite pigmentaire soit le plus utilisé, notons que les modèles rd10 et rd16 ont aussi montré une réponse à la lumière suite au transfert d'optogènes. Ainsi, comme pour la stratégie ciblant les cônes dormants, l'indépendance du transfert d'optogènes vis à vis de l'origine de la mutation génétique est encore une fois prouvée. De plus les analyses de microélectrodes en ligne (MEA) sur explants témoignent d'une restauration du système ON /OFF rétinien alors que seule la population bipolaire ON est traitée. Comment l'expliquer ? Les jeux de rétrocontrôle négatif du système ON sur le système OFF, et les levées d'inhibition qui en découlent, peuvent expliquer pourquoi le système OFF est lui aussi partiellement restauré.

Cette stratégie thérapeutique permet donc le maintien du système ON/OFF de la rétine, comme pour les stratégies ciblant les cônes dormants, mais elle offre une fenêtre thérapeutique plus longue car les cellules bipolaires subsistent bien plus longtemps que les photorécepteurs lors de dégénérescence rétinienne. Cela explique pourquoi le ciblage des cellules bipolaires ON est aujourd'hui le plus couramment utilisé dans les approches de transfert d'optogènes.

Avant de passer au transfert de gène dans les cellules ganglionnaires, j'aimerais faire un aparté sur l'utilisation du modèle murin rd1 comme modèle de thérapie génique. Ce modèle de rétinite pigmentaire, déficient pour la sous-unité bêta du gène Pde6 de la cascade de phototransduction, est le premier modèle naturel de DRH, découvert en 1924. Et malgré de nombreuses tentatives (infructueuses), il n'a été traité par thérapie génique de remplacement que très récemment (Nishiguchi et al. 2015) alors que le transfert d'optogène ChR2 avait permis depuis 2006 (Bi et al. 2006) la restauration de fonctions corticales chez ce modèle. Et pour cause, il a été montré que depuis les années 50 au moins, les souris rd1 vendues par les laboratoires Jackson, Charles Rivers et Harlan étaient, en réalité, doubles mutantes. Ainsi, après 90 ans d'utilisation de ce modèle, l'équipe de *Nishiguchi et al.*, a découvert une seconde mutation sur le gène Gpr179 abolissant le fonctionnement des cellules bipolaires ON. Par conséquent, cela démontre bien que le traitement par transfert d'optogènes ne nécessite pas de connaître l'origine de la (des) déficience(s) génétique(s), et qu'il permet aussi de traiter des modèles animaux déficients au niveau des neurones des couches internes tels que les cellules bipolaires.

c. Par transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires.

Cette partie représente le cœur de ce sujet de thèse car, le ciblage des cellules ganglionnaires rétinienne par une stratégie de transfert d'optogènes, est l'approche thérapeutique que notre équipe a souhaité évaluer chez un modèle canin de DRH. Les cellules ganglionnaires sont en théorie les cibles privilégiées pour traiter à long terme des patients avec une dégénérescence rapide. Dernier maillon de la chaîne de transmission de l'information lumineuse, ce sont elles qui offrent aussi la plus grande indépendance vis à vis de l'origine génétique de la maladie, dans la mesure où elles pourraient permettre de traiter des patients présentant des anomalies au niveau de toutes les populations cellulaires nécessaires au transit de l'information lumineuse. Cependant, bien qu'étant une piste d'amélioration étudiée (Greenberg et al. 2011) il n'y a pour l'instant aucun moyen de restreindre strictement l'expression des optogènes dans le soma ou en périphérie des cellules ganglionnaires. Ainsi il n'est pas aujourd'hui possible d'envisager une conservation du système ON/OFF par transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires. De fait, cette stratégie serait plus indiquée pour les cas les plus graves, où les autres stratégies ciblant des populations plus en amont, ne peuvent plus s'appliquer. Là encore, de nombreuses preuves de concept ont été faites, démontrant la capacité des optogènes à restituer une sensibilité rétinienne et corticale à la lumière par l'intermédiaire de la réactivation des cellules ganglionnaires. Ainsi, trois modèles de rétinite pigmentaire ont été traités par transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires, deux chez la souris: rd1 (Bi et al. 2006, Lin et al. 2008, Zhang et al. 2009, Gaub et al. 2014) et rd10 (Doroudchi et al. 2011) et un modèle de rat: le rat RCS (Tomita et al. 2007, Tomita et al. 2014). Pour la plupart de

ces publications, la preuve d'un effet sur le comportement des rongeurs vis à vis de la lumière a été démontrée.

Les optogènes utilisés dans ces différentes publications sont d'origines très variées. Certains sont complètement synthétiques comme LiGluR, d'autres sont des versions optimisées des optogènes découverts à l'état naturel (Gaub et al. 2014, Tochitsky et al. 2014, Tomita et al. 2014, Gaub et al. 2015), à l'image de l'optogène Catch dérivé de ChR2 (Kleinlogel et al. 2011, Cronin et al. 2014) dont la mutation L132C abaisse le seuil de sensibilisation de l'optogène et donc rend la dépolarisation possible à des intensités lumineuses plus faibles. Enfin, dans les publications les plus récentes on voit apparaître l'utilisation des opsines naturelles telles que la rhodopsine (Cehajic-Kapetanovic et al. 2015) ou la mélanopsine, fusionnée avec un récepteur G spécifique des cellules bipolaires (van Wyk et al. 2015). L'amélioration d'optogènes dérivés d'organismes très éloignés de l'homme ou l'utilisation d'opsines mammifères témoignent d'une recherche de protéines répondeuses à des spectres et des intensités lumineuses plus proches des conditions physiologiques humaines. Les quantités minimales de lumières nécessaires à activer les optogènes de première génération tel que ChR2 soulèvent des questions de toxicité à long terme (Fig. 13A). En effet, une étude rapporte des faisceaux d'indices donnant à penser que des intensités lumineuses supérieures à 500W/m^2 peuvent engendrer des réponses photophobiques chez la drosophile ou le nématode via l'activation de protéines G, telles que LITE-1 et LITE-2 (Edwards et al. 2008). Or il faut des intensités lumineuses environnant les 500W/m^2 pour activer l'optogène ChR2 (Kleinlogel et al. 2011, Husson et al. 2013).

De même, le spectre d'absorption des optogènes est pris en compte et explique le développement de nombreuses protéines dérivées de ChR2 (VchR1-ChR2 ; C1V1-ChR2) dont le spectre est décalé dans le rouge (Schneider et al. 2015) pour limiter la toxicité éventuelle de la lumière bleue à long terme (Fig. 13B). Des études ont entrepris de rechercher des analogues naturels de ChR2 chez plus de 62 autres espèces d'algues et ont mené à la découverte d'un candidat particulièrement intéressant : Chrimson (Klapoetke et al. 2014). Cet homologue de ChR2 découvert très récemment dans une autre espèce de *Chlamydomonas*, *Chlamydomonas noctigama*, aurait un spectre compris entre 600nm et 720nm et serait capable de répondre à des flashes de 0,5ms (Schild and Glauser 2015) avec un retour à l'état de repos en 21ms. Autre avantage, il nécessite des stimulations entre 60W/m^2 à 140W/m^2 , soit bien moins que ChR2, et moins que la limite des 500W/m^2 décrite comme pouvant initier des réponses photophobiques. Et pour encore élargir les possibilités offertes par les optogènes, l'équipe à l'origine de la découverte de Chrimson, a fusionné ce dernier avec l'optogène ChR2 pour donner ChrimsonR. Cet optogène hybride a l'avantage d'être sensible à la fois dans le bleu et dans le rouge, élargissant ainsi le spectre visuel. ChrimsonR conserve les temps de retour à un état de repos des deux optogènes qui le composent, puisqu'il s'inactive en deux millisecondes suite à des

stimulations bleues, et en une vingtaine de millisecondes après des activations dans le rouge (Klapoetke et al. 2014).

Ces optogènes de dernière génération suscitent à juste titre un grand intérêt. Mais cela ne réduit en rien l'importance d'une première évaluation *in vivo* du transfert d'optogènes, avec des optogènes de première génération, chez des modèles grands animaux.

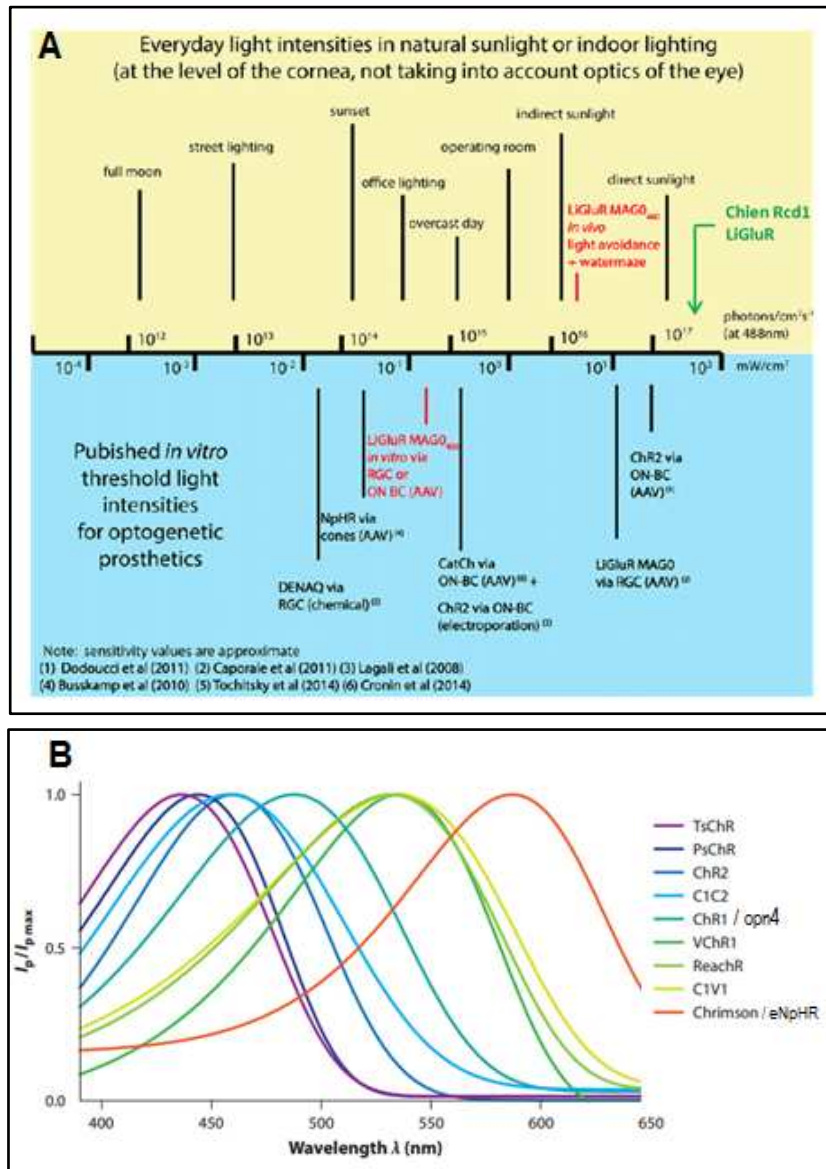


Figure 13: Spectres d'absorption et intensités lumineuses requises pour l'activation de différents optogènes *in vivo*.

(A)Résumé des intensités lumineuses, avec leur équivalent dans la vie quotidienne, nécessaires à l'activation d'optogènes ayant déjà démontré une restauration de fonctions visuelles *in vivo* ou *ex vivo*. (D'après : Gaub et al., 2014)

(B)Spectres d'absorption normalisés des optogènes homologues ou des versions optimisées de la channelrhodopsine, ainsi que ceux de la mélanopsine et de l'halorhodopsine. Abréviations: **C1C2/ReachR/C1V1**, versions dérivées de ChR2 ; **ChR1/ChR2**, channelrhodopsine de *Chlamydomonas reinhardtii*; **Chrimson**, homologue de la channelrhodopsine chez *Chlamydomonas noctigama* ; **PsChR**, homologue de la channelrhodopsine chez *Platymonia subcordiformis*; **TsChR**, homologue de la channelrhodopsine chez *Tetraselmis striata*; **VChR1**, homologue de la channelrhodopsine chez *Volvox carteri*. (Adapté d'après : Schneider et al., 2015)

III. L'évaluation du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires canines.

A. Intérêt de l'évaluation du transfert de gènes chez un modèle gros animal tel que le chien.

Les modèles rongeurs ont permis l'essor de la thérapie génique dans l'œil. Ils représentent une étape incontournable pour une preuve de concept chez le mammifère. La possibilité de pouvoir facilement modifier leur génome, encore plus maintenant avec les systèmes TALEN ou Cas9, pour produire des animaux transgéniques déficients y est pour beaucoup. Mais ils ont bien d'autres avantages par rapport aux modèles gros animaux, notamment leur faible coût d'utilisation et d'hébergement ainsi que leur temps de reproduction court permettant d'obtenir rapidement un grand nombre d'individus déficients. Aucune étude de transfert de gènes chez des modèles gros animaux n'est faite sans preuve préalable sur des modèles rongeurs. Cette thèse est d'ailleurs le fruit d'études concluantes menées sur la souris rd1 (Lin et al. 2008), le rat RCS (Tomita et al. 2007) et la souris rd16 (Busskamp et al. 2010), qui justifient l'évaluation du transfert d'optogènes chez des modèles gros animaux.

Etant donné les difficultés d'utilisation et le coût, l'étude du transfert d'optogènes chez des modèles diurnes gros animaux plus proches de l'Homme est beaucoup plus rare, pour ne pas dire absente. En effet, celle-ci se limite à ce jour à une seule publication témoignant d'un transfert d'optogènes réussi chez un modèle gros animal, en se limitant à une étude *ex vivo* des rétines traitées, sur deux chiens déficients pour le gène *Pde6 β* (Gaub et al. 2014). Pourtant le passage du rongeur à des modèles grands animaux tels que les chiens, couramment utilisés en tant que modèles de DRH pour les preuves de concept de thérapie génique de remplacement, est une étape cruciale.

Les mammifères diurnes tels que les primates présentent au niveau de leur rétine une zone riche en photorécepteurs cônes leur permettant d'avoir une vision nette et précise : la macula. Plus on se rapproche du centre de la macula, plus les photorécepteurs bâtonnets se font rares, c'est la fovéa, jusqu'à atteindre une zone de dépression exclusivement faite de cônes : la fovéola (Fig. 14 A et B). Notre capacité à lire, conduire ou à faire toute autre action du quotidien nécessitant une vision précise, est rendue possible par la présence de cette zone très riche en cônes. Le chien présente lui aussi une structure similaire riche en cônes, appelée "visualstreak" équivalente à la macula des primates (Beltran et al. 2014), de forme plus allongée que circulaire et contenant en son centre une zone quasi-exclusivement constituée de cônes : l'aeracentalis (Fig. 15 A et B).

A l'inverse les animaux nocturnes comme les rongeurs, ont une rétine adaptée à la vision de nuit. La vision de nuit reposant sur l'action des photorécepteurs bâtonnets, il n'est pas étonnant de constater que les photorécepteurs cônes sont peu représentés dans une rétine murine. Ils représentent à peine 2,8% des photorécepteurs totaux (Jeon et al. 1998) alors qu'ils sont deux fois plus nombreux

dans les rétines de primates. Mais plus que la quantité, c'est la répartition des cônes qui différencie singulièrement les rongeurs des modèles grands animaux. La distribution des cônes est homogène chez les rongeurs (Carter-Dawson and LaVail 1979) ce qui explique l'absence de structure maculaire dans leur rétine. Ainsi l'étude des pathologies affectant les cônes, ou encore l'étude de leur survie dans le cadre des rétinites pigmentaires, est assez limitée chez ces modèles rongeurs. Ce n'est d'ailleurs probablement pas un hasard s'il n'y a pas de modèle de dystrophie cônes-bâtonnets chez le rat ou la souris. En effet tous les modèles rongeurs de DRH portant sur une déficience génétique des cônes sont stationnaires. Or, il est probable que la sécrétion de facteurs de survie par les photorécepteurs soit indispensable à leur maintien (Elachouri et al. 2015). Ainsi dans une rétinite pigmentaire, quand les bâtonnets disparaissent suite à la déficience, ils laissent un vide important (ils représentent 95% à 98% des photorécepteurs totaux selon les espèces) et ne sont plus présents pour sécréter des facteurs de survie. Cela pourrait expliquer en partie pourquoi les cônes disparaissent à leur tour alors qu'ils ne sont pas affectés par la mutation. Mais chez les rongeurs, dans le cadre d'une déficience des cônes, de par leur faible nombre éparpillé dans la rétine, la disparition des cônes et des facteurs qu'ils sécrètent n'a probablement que peu d'impact sur la survie des bâtonnets. Ainsi, leur densité très faible partout sur la rétine explique peut-être l'absence de modèle progressif affectant indirectement la population bâtonnet (Saade et al. 2013). En conclusion, l'évaluation de l'effet du transfert de gènes ou d'optogènes sur les dystrophies cônes-bâtonnets ne peut se faire que chez des animaux diurnes tel que le chien cord1 (Lheriteau et al. 2014). De même, les preuves de concept, dont le but est de réactiver les cônes dormants via des optogènes, auront bien plus de portée et de pertinence chez un modèle diurne gros animal.

Deuxième avantage incontestable des grands animaux sur les modèles murins : l'étude à moyen et long terme. Difficile d'envisager une étude à plus d'un an post-injection avec des souris. Or nous en avons parlé, l'évolution de la dégénérescence au cours du temps est un point clef dans les stratégies de transfert d'optogènes. Aussi bien pour savoir si le traitement perdure dans le temps malgré la progression potentielle de la dégénérescence mais aussi pour évaluer à moyen et long terme la tolérance d'une telle approche (l'utilisation de lumière bleue dans des proportions importantes sur plusieurs années, le maintien de l'expression du transgène).

En parlant de tolérance, le système immunitaire des chiens est aussi beaucoup moins tolérogène que ne l'est celui des rongeurs vis à vis de l'expression de transgènes ectopiques. Comme le démontre la sécrétion d'interférons gamma et l'infiltration en lymphocytes T des muscles exprimant la β -galactosidase, suite à un transfert de gènes médié par vecteurs rAAV2 chez le chien. Alors que dans les mêmes conditions d'expérience les modèles rongeurs ne présentent pas de signe de réponse immunitaire (Yuasa et al. 2007). Quand on sait que plusieurs des optogènes couramment utilisés sont

dérivés de génomes bactériens et algaux, il est évident que l'innocuité de ces traitements sera d'un enjeu majeur, même si l'œil, contrairement aux muscles, est connu pour être un organe immuno-privilégié.

Enfin les volumes que l'on administre à une souris pour évaluer l'efficacité d'un traitement (1 μ l) sont en moyenne 100 fois inférieurs à ceux que l'on peut injecter dans l'œil d'un chien ou d'un primate (80 - 400 μ l selon le mode d'injection). Certaines barrières anatomiques de l'œil, comme le vitrée ou la membrane limitante interne, sont de taille tellement faible chez le rongeur qu'il n'est même pas envisageable d'influer dessus. Cela modifie sensiblement le choix des vecteurs à utiliser ainsi que l'approche chirurgicale. L'évaluation du transfert d'optogènes chez des modèles rongeurs peut donc présenter de grandes différences avec ce que l'on pourrait obtenir chez des modèles gros animaux et donc chez l'Homme.

Ainsi, tous ces arguments en faveur d'une étude chez le gros animal, justifient l'intérêt de poursuivre l'étude sur des modèles présentant des similarités anatomiques qui influenceront les résultats de l'étude, et donc, permettront d'être mieux préparé avant un éventuel passage chez l'Homme.

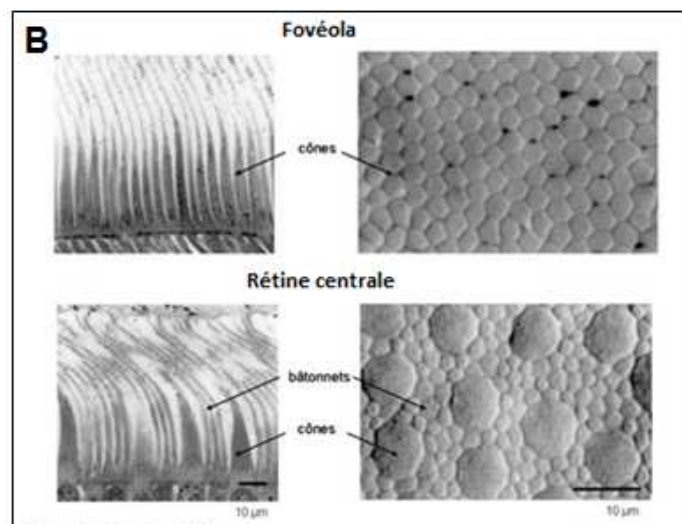
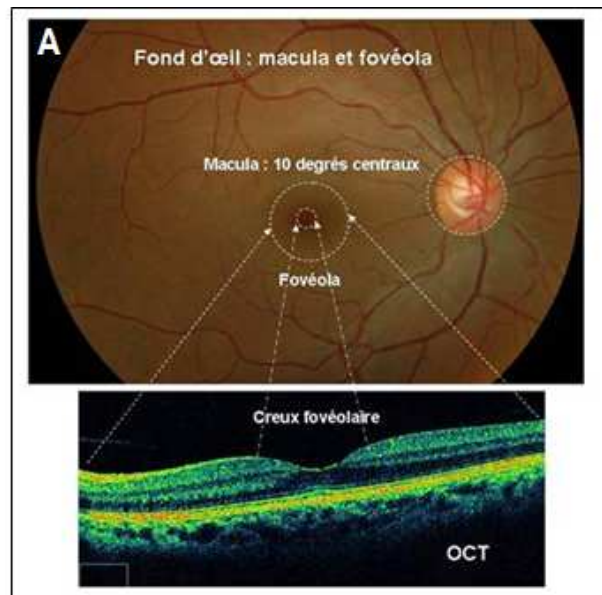


Figure 14: Répartition anatomique des cônes dans une rétine de primate.

(A) Fond d'œil d'une rétine de primate précisant la délimitation de la zone maculaire et fovéolaire, associé à une image OCT de ces mêmes zones pour en préciser la stratification particulière. (Source : <http://lodel.irevues.inist.fr/>)

(B) Images de microscopie électronique représentant la proportion de cônes et de bâtonnets en zone fovéolaire et maculaire. (D'après : Curcio et al., 1990)

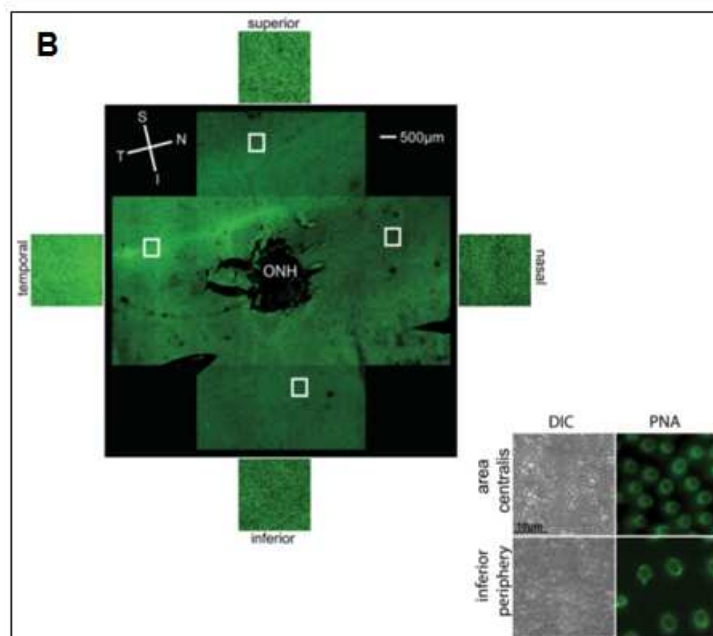
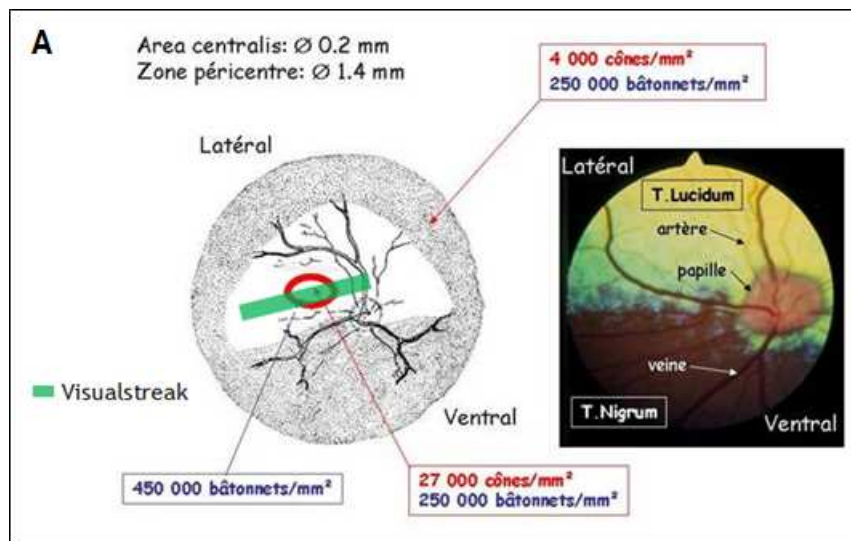


Figure 15: Répartition anatomique des photorécepteurs dans une rétine canine.

(A) Régionalisation fonctionnelle de la neurorétine canine associée à une funduscopie canine. (Adapté depuis : <http://lodel.irevues.inist.fr/>)

(B) Images de microscopie confocale avec un marquage spécifique des cônes (PNA : peanut agglutinin) permettant de visualiser la répartition des cônes dans une rétine canine. On note une zone étendue d'enrichissement en cônes, appelé le visualstreak. (D'après : Mowat et al., 2008)

B. L'avantage du modèle canin Rpe65^{-/-} pour une preuve de concept du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires rétiniennes.

La disponibilité en modèles canins naturels de DRH, associée à tous les avantages cités ci-dessus font du chien un atout majeur pour l'évaluation des stratégies de transfert de gènes et notamment du transfert d'optogènes. Notre équipe s'est spécialisée dans l'évaluation du transfert de gènes chez le chien, avec trois preuves de concept chez trois modèles de DRH. Une des principales questions pour ce projet d'évaluation du transfert d'optogènes chez le chien a été : Lequel de nos trois modèles serait le plus pertinent pour cette étude ? Chacun de nos trois modèles est déficient pour une population rétinienne différente, et les vitesses de dégénérescence sont également différentes.

Ainsi, nous disposons du modèle cord1 canin de dystrophie cône-bâtonnet portant une déficience dans le gène de structure RPGRIP1. Ce gène de structure est décrit comme étant nécessaire aux cils connecteurs des photorécepteurs cônes, ce qui explique la perte de fonction cône en ERG dès l'âge de 2 mois. Les bâtonnets conservent leur fonction un peu plus longtemps, jusqu'à l'âge d'un an. La dégénérescence rétinienne est assez rapide puisque la couche nucléaire externe a presque disparu à l'âge de deux ans (Lheriteau et al. 2009, Lheriteau et al. 2014).

L'équipe a aussi fait la preuve de l'efficacité d'un traitement par thérapie génique de remplacement sur un modèle de rétinite pigmentaire : le modèle rcd1 (Petit et al. 2012). Ce modèle est l'homologue canin des modèles rd1 et rd10 murins, puisque muté sur le gène Pde6beta impliqué dans la cascade de phototransduction des bâtonnets. Bien que le fonctionnement des bâtonnets soit perdu dès la naissance, ce modèle conserve une fonction cône détectable en ERG au-delà de 18 mois grâce à la survie d'un petit nombre de cônes fonctionnels dans le visualstreak. Par contre, hormis dans cette toute petite zone épargnée qu'est le visualstreak où une poignée de cônes peuvent survivre pendant 4 ans, la dégénérescence des photorécepteurs est ailleurs extrêmement rapide (Pichard et al. 2016). Ainsi, on observe une perte de la moitié des photorécepteurs dès l'âge de 4 mois, suivie par la perte de la couche nucléaire externe à 1 an, aboutissant à l'âge de trois ans et demi à une perte totale de la couche nucléaire externe et interne. Ne subsiste que la couche des cellules ganglionnaires présentant un remodelage profond (Fig. 7).

Enfin, notre troisième et dernier modèle est le chien briard déficient pour le gène Rpe65. Ce modèle canin a été particulièrement étudié depuis sa description en 1989 (Narfstrom et al. 1989). Puis une nouvelle étape a été franchie lorsque l'identification du gène muté a eu lieu en 1998 (Aguirre et al. 1998). Le gène Rpe65 qui lui fait défaut est nécessaire au fonctionnement du cycle visuel, au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien. En effet, cette enzyme d'un poids moléculaire de 65kDa, permet le recyclage d'ester de retinol en 11-cis retinol, étape essentielle du recyclage des dérivés de

la vitamine A (Fig. 2A). Sans ce renouvellement en 11 cis-rétinal, effectué par l'EPR pour les bâtonnets et par les cellules de Müller pour les cônes, les opsines des photorécepteurs ne sont plus stimulables. La déficience du gène *Rpe65* affecte directement les deux populations photoréceptrices. Leurs fonctions sont sévèrement et précocement impactées, ce qui classe cette DRH dans la catégorie des amauroses congénitales de Leber. En effet, chez ce modèle canin aucune activité rétinienne n'est détectable en ERG au bout de 6 à 8 mois après la naissance (Lheriteau et al. 2010). A contrario, la dégénérescence rétinienne est lente, surtout comparée aux deux modèles précédents. Des chiens déficients âgés de 5 ans et demi présentent une perte d'environ 41,5% des photorécepteurs totaux au niveau de la rétine périphérique, zone la plus affectée par la dégénérescence (Mowat et al. 2013). Alors que pour rappel, l'ensemble des photorécepteurs est perdu deux ans après la naissance chez le modèle *cord1* et même dès 1 an chez le chien *rcd1*. Cette dégénérescence lente s'accompagne de nombreux signes témoignant de mécanismes de remodelage rétinien, tels que le développement incontrôlé de prolongements synaptiques des bâtonnets en rétine périphérique inférieure (Klein et al. 2014) ou encore la délocalisation des opsines des cônes dans les segments internes et notamment la dégénérescence des cônes S après 18 mois (Mowat et al. 2013). Comme je l'ai déjà développé dans la partie II.A.2, ce modèle a grandement contribué au lancement des premiers essais de thérapie génique dans l'œil chez l'Homme (Bainbridge et al. 2015, Cideciyan et al. 2015, Bennett et al. 2016).

Le transfert d'optogènes étant supposé totalement indépendant de l'origine génétique de la maladie et étant donné que nous cibons les cellules ganglionnaires, tous ces modèles de DRH sont éligibles aux traitements. Nous avons cependant estimé que le modèle le plus favorable pour une preuve de concept est le chien *Rpe65^{-/-}* pour deux raisons :

1) Pour une première preuve de concept de transfert d'optogènes chez le chien, il est intéressant de s'affranchir des problèmes éventuels liés à la dégénérescence de la rétine. Les cellules ganglionnaires survivent longtemps après la perte des photorécepteurs, mais on connaît encore mal l'impact du remodelage rétinien sur cette population. De plus, on sait qu'à des stades avancés de dégénérescence rétinienne, quand la couche nucléaire interne n'est plus identifiable, les cellules ganglionnaires se délocalisent dans les zones les plus externes de ce qu'il reste de la couche plexiforme interne (Marc et al. 2003). Ayant perdu leurs connections dendritiques avec les cellules bipolaires et étant déplacées, dans quelles mesures ces cellules sont-elles fonctionnelles ? On ne sait pas, car dans l'ensemble des publications faisant état d'un transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires chez des modèles rongeurs de DRH (Bi et al. 2006, Tomita et al. 2007, Lin et al. 2008, Gaub et al. 2014, Tochitsky et al. 2014), les animaux ont été injectés à des stades où la couche nucléaire interne est encore bien présente et les cellules ganglionnaires encore bien en place. En

choisissant un modèle de dégénérescence plus lent que les modèles *cord1* ou *rcd1*, on élimine autant que possible l'impact de la dégénérescence sur les cellules ganglionnaires et on se place donc dans les meilleures conditions possibles pour savoir si le transfert d'optogènes *Opn4*, *ChR2* ou *eNpHR* est efficace pour réactiver les cellules ganglionnaires de modèles gros animaux de DRH.

2) Ce modèle est celui qui présente la perte de fonction totale la plus précoce. Or nous souhaitons injecter les animaux uniquement après la disparition totale de fonctions ERG détectables. D'ailleurs cela n'aurait pas de sens de vouloir donner une perception lumineuse artificielle à des animaux dont on peut détecter les fonctions rétiniennes. Nous n'avons aucune idée de ce qui se passerait avec des cellules ganglionnaires qui recevraient des signaux électriques provenant de leurs optogènes mais aussi des cellules bipolaires. Les signaux s'annuleraient-ils ? S'additionneraient-ils ? Les résultats obtenus seraient très probablement ininterprétables et on ne saurait jamais avec certitude lequel des deux systèmes visuels, endogène ou artificiel, serait à l'origine des réponses obtenues. Il nous faut donc injecter des chiens n'ayant plus d'activité électrique détectable, le plus rapidement possible. Le gain de temps n'est pas négligeable (6 mois à 1 an par rapport aux autres modèles) et nous permet de réduire les temps d'attente avant d'injecter les animaux, et donc de minimiser la durée de l'étude et les coûts financiers qui en découlent.

Ainsi, du fait de sa vitesse de dégénérescence extrêmement lente et de son absence rapide de fonction rétinienne, le chien *Rpe65^{-/-}* est le chien sur lequel a débuté notre étude du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires.

C. Optimisation du taux de transduction dans les cellules ganglionnaires canines.

1. Le choix du mode d'injection.

Pour conduire cette étude nous avons utilisé comme produit thérapeutique un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (rAAV). Il y a deux voies d'injection couramment utilisées pour transduire les cellules de la rétine et de l'épithélium pigmentaire rétinien à l'aide de vecteurs recombinants : l'injection sous-rétinienne et l'injection intravitréenne (Khabou and Dalkara 2015) (Fig. 16 A). Le choix de la voie d'administration influence directement le taux de transduction pour une population rétinienne donnée (Fig. 16B). En témoigne cette étude démontrant qu'un même vecteur rAAV, selon le mode d'injection intravitréen ou sous-rétinien, va conduire à une transduction différente des cellules de la rétine (Igarashi et al. 2013). Le choix entre les deux modes d'administration se fait de manière simple, selon la proximité de la population ciblée. L'injection sous-rétinienne consiste à déposer le vecteur recombinant entre la couche de l'EPR et les segments externes des photorécepteurs. La bulle ainsi créée conduit au décollement local de la rétine, qui se recolle en général dans les 48h/72h conjointement à la diffusion du vecteur. C'est la méthode

privilegiée pour le transfert de gènes dans l'EPR, les photorécepteurs, les cellules horizontales et éventuellement les cellules bipolaires. La seconde approche consiste à injecter le vecteur dans la cavité vitrée au plus près de la rétine et donc des cellules ganglionnaires. C'est le mode d'injection privilégié pour transduire les cellules ganglionnaires (Provost et al. 2005, Mowat et al. 2014), amacrines ou éventuellement les cellules de Müller (Vacca et al. 2016) et les cellules bipolaires (Cronin et al. 2014, Lu et al. 2016).

2. Choix du sérotype AAV pour la transduction des cellules ganglionnaires.

Ce choix du mode d'administration dicté par la proximité de la population cible est cependant de moins en moins vrai avec l'essor de nouveaux sérotypes AAV dérivés des 12 sérotypes sauvages. Pour cause, l'injection intravitréenne est de plus en plus étudiée en remplacement de la voie intravitréenne pour atteindre les photorécepteurs et l'EPR. Cela est rendu possible par la diffusion accrue de ces sérotypes hybrides (Dalkara et al. 2013). Cette nouvelle approche pour atteindre les couches externes de la rétine est bien moins invasive et présente donc moins de risque qu'une injection sous-rétinienne dans une rétine fragilisée par une dégénérescence. On limite ainsi le risque de décollement ou de déchirure de la rétine. La modification génétique des capsides des AAV sur leur domaine de liaison aux récepteurs cellulaires permet aux vecteurs de traverser plus efficacement les différentes couches rétinienne sans être capté par les autres populations neuronales sur son passage. Une modification du vecteur AAV2 sur son domaine de liaison à l'héparine sulfate, en un mutant appelé AAV 7m8, permet après injection intravitréenne de transduire efficacement les photorécepteurs murins mais aussi ceux de la macula des primates (Dalkara et al. 2013). Basé sur un raisonnement identique, la modification de l'AAV2/8 en AAV2/8BP2, via la modification de son domaine de liaison à l'héparine sulfate, lui permet de transduire plus efficacement les cellules bipolaires après injection intravitréenne ou sous-rétinienne (Cronin et al. 2014). La modification des protéines de capsid de l'AAV (VP1,2,3) permet aussi d'améliorer le cheminement de la cassette d'expression vers le noyau et donc le taux de transduction. Cet avantage explique le développement des variants Y730F et Y444F de l'AAV2 dans lesquels la substitution d'une tyrosine par un autre acide aminé sur la protéine VP3 limite l'action de protéines tyrosine kinase (Petrs-Silva et al., 2009). Ces protéines sont connues pour entraîner l'ubiquitination, et donc la dégradation des AAV, dans la cellule hôte. Ainsi, grâce à ces modifications de capsides, il a été montré qu'un vecteur AAV2/2 pouvait atteindre plus efficacement le noyau des cellules bipolaires, après injection intravitréenne (Petrs-Silva et al. 2009).

Un autre avantage de l'injection intravitréenne est la plus grande diffusion du vecteur autour de la zone d'injection, contrairement à la bulle temporaire et très délimitée formée par l'injection sous-

rétinienne. Enfin, le remodelage rétinien influence directement le tropisme des vecteurs. La déstabilisation de la rétine, comme la perte des photorécepteurs rend plus accessible les cellules bipolaires pour un transfert de gènes. C'est ce qui est observé dans le cas de souris rd1 injectées par voie sous-rétinienne, après la disparition de la couche des photorécepteurs. En effet, l'AAV2/2 (non modifié), qui n'est pourtant pas connu pour être très efficace pour transduire les cellules bipolaires chez des souris présentant encore des photorécepteurs, permet dans cette configuration de transduire efficacement la couche nucléaire interne (Liu et al. 2016). Autre cas de figure de modification du tropisme lié à la dégénérescence: la déstabilisation des cellules de Müller, formant la membrane limitante interne, permet le passage facilité des AAV1 et AAV5 quand une mutation affecte cette population cellulaire (Kolstad et al. 2010). Par conséquent selon le modèle de DRH et l'âge au moment de l'injection (qui influe sur le stade de dégénérescence), un même vecteur injecté de la même manière va avoir un profil de transduction différent. Ainsi il faut prendre en considération l'âge, le choix du modèle, le mode d'injection, le sérotype et les éventuelles modifications de capsides avant d'établir une correspondance entre un sérotype d'AAV et ses populations cibles dans la rétine. Heureusement certaines constantes se dégagent quand même concernant le choix du sérotype et de sa cible, comme décrit dans ce tableau (Fig. 16 B).

Dans le cadre de notre projet de transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires, le choix du sérotype a été facilité par le nombre important de publications décrivant l'efficacité de l'AAV2/2 à transduire les cellules ganglionnaires après injection par voie intravitréenne (Dudus et al. 1999, Folliot et al. 2003, Bi et al. 2006). Le taux de transduction par ce sérotype peut atteindre jusqu'à 65% des cellules de la couche des cellules ganglionnaires chez le rat, loin devant les autres sérotypes (Hellstrom et al. 2009). Le tropisme peut varier d'une espèce à l'autre et limite donc les conclusions que l'on peut tirer des études chez le rongeur. Nous sommes quand même confortés par le choix de ce sérotype puisque des études réalisées chez le chien rapportent aussi la capacité de l'AAV2/2 à transduire les cellules ganglionnaires canines. Ainsi, et bien qu'il n'y ait pas eu d'évaluation du taux de transduction, deux études rapportent l'expression de transgènes rapporteurs au niveau des cellules ganglionnaires après injection intravitréenne d'un rAAV2/2 (Dudus et al. 1999, Provost et al. 2005).

Les dernières publications nous confortent dans le choix du sérotype puisque des études publiées récemment se sont elles aussi appuyées sur l'AAV2 et ses dérivés pour transduire efficacement les cellules ganglionnaires canines (Gaub et al. 2014, Boyd et al. 2016).

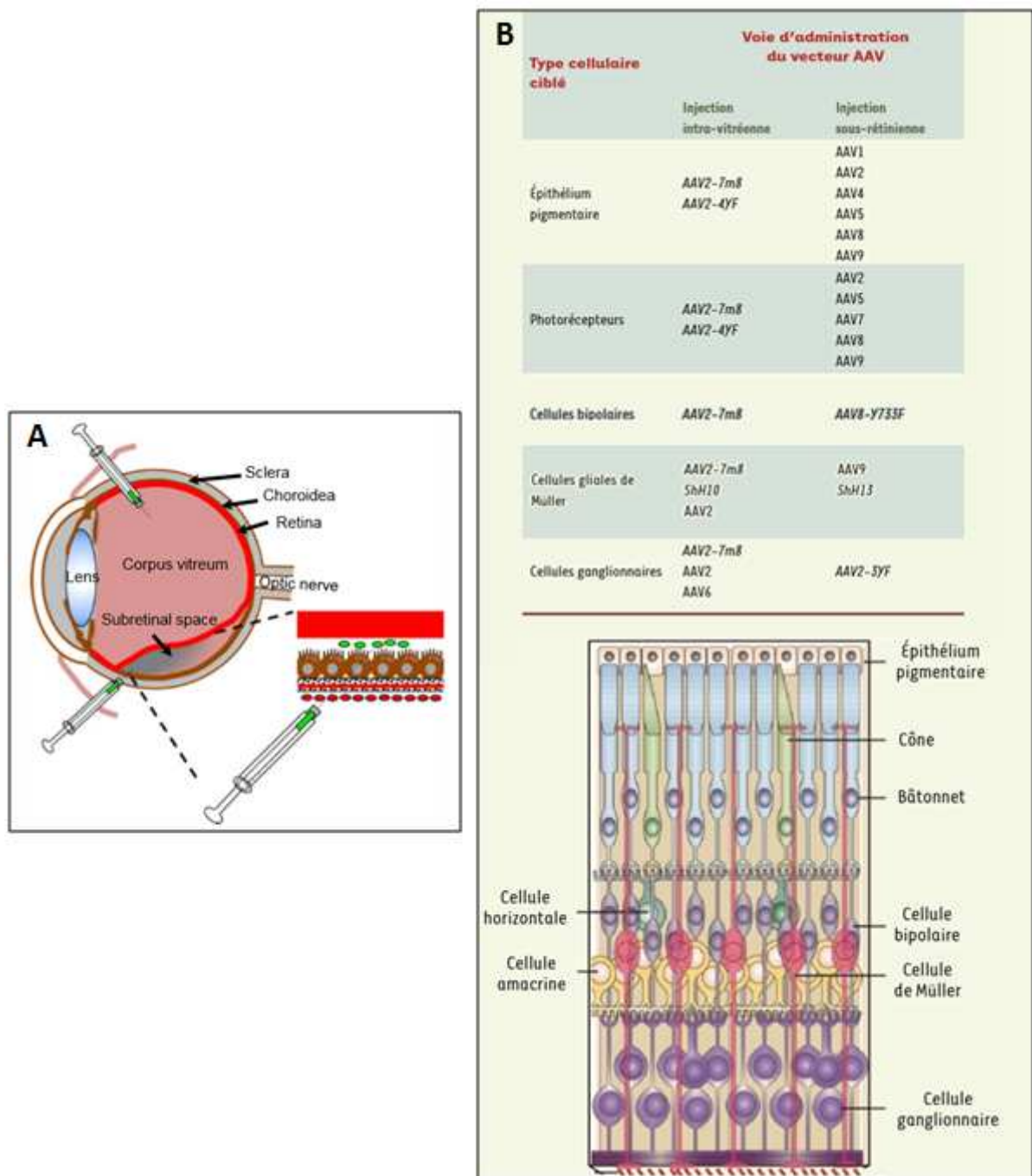


Figure 16 : Tropisme des différents sérotypes d'AAV selon la voie d'administration dans l'œil.

A. Schématisation des deux modes d'injection, intravitréen ou sous-rétinien, pour transduire la rétine et l'épithélium pigmentaire rétinien. (D'après : Askou et al., 2014).

B. Détail des sérotypes d'AAV les plus efficaces pour transduire une population rétinienne donnée, selon la voie d'administration envisagée. (D'après : Khabou et Dalkara D., 2015).

3. L'optimisation de la transduction par voie intravitréenne au travers des barrières anatomiques naturelles de l'œil.

La stratégie thérapeutique de l'étude semble maintenant toute tracée puisque nous avons défini le produit thérapeutique comme étant un vecteur recombinant rAAV2 contenant un transgène optogénétique (ChR2, eNpHR ou Opn4) administré par voie intravitréenne chez le modèle canin *Rpe65^{-/-}*. On peut cependant encore préciser le geste chirurgical, qui constitue une étape cruciale vers l'obtention d'une transduction maximale des cellules ganglionnaires rétiniennes.

Maximiser le taux de transduction dans les différentes couches de la rétine représente un enjeu évident pour toute stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation de vecteurs viraux. Dans la rétine de nombreuses structures anatomiques sont de potentielles barrières à la diffusion du vecteur. Ainsi lors d'injections intravitréennes, les vecteurs devront franchir successivement : le vitrée, la hyaloïde, la membrane limitante interne voire même la couche de fibres nerveuses dont l'épaisseur augmente sensiblement à l'approche du nerf optique (jusqu'à 300 μm chez l'Homme). Il n'est donc pas totalement surprenant d'observer, après injection intravitréenne d'un vecteur AAV contenant un gène rapporteur tel que l'eGFP, des zones de transduction anormalement réparties sur la rétine. Plus précisément, on constate chez le primate que le profil de transduction des cellules ganglionnaires forme un anneau autour de la fovéa (Fig. 17A). On ne sait pas plus expliquer pourquoi la fovéa, ou à l'inverse le reste de la rétine centrale, sont strictement dépourvues de cellules transduites (Yin et al. 2011). D'autre part, notre équipe a déjà observé chez nos modèles canins, des transductions plus élevées autour des vaisseaux sanguins, suggérant là encore que l'anatomie de la rétine influait sur la transduction (Fig. 17B et 17C). Les hypothèses pour expliquer ces phénomènes portent sur l'épaisseur moindre de la membrane limitante interne au niveau des vaisseaux sanguins et de la macula (Matsumoto et al. 1984). Cela permet donc peut-être d'expliquer la plus faible transduction en rétine centrale (zone parafovéale exclue) observée chez les primates. Mais cette hypothèse a été remise en question récemment par une étude qui a démontré, par marquage de la membrane limitante interne canine, que le taux de transduction de l'AAV2 est indépendant de son épaisseur (Boyd et al. 2016). Difficile donc d'expliquer les profils de transduction décrits précédemment, il est probable que la membrane limitante interne ne soit pas la seule en cause. Mais ce qui est un peu mieux connu c'est que son absence ou sa porosité permet une transduction améliorée. En effet, le modèle murin *Dp71^{-/-}*, portant une déficience au niveau des cellules de Müller et présentant une déstabilisation de la membrane limitante interne, présente un profil de transduction vis à vis de l'AAV5 ou de l'AAVshH10 largement modifié par rapport aux souris saines (Vacca et al. 2014). Cela permet notamment à l'AAV5 d'atteindre l'épithélium pigmentaire rétinien après injection intravitréenne. Cette modification de tropisme ne semble affecter que ces deux sérotypes d'AAV.

Pour s'affranchir de la membrane limitante interne, il est possible de précéder l'injection des vecteurs par l'administration d'enzymes protéolytiques comme le mélange Pronase E contenant plus d'une dizaine de protéases non spécifiques, à même de digérer la membrane limitante interne (Dalkara et al. 2009). Ainsi, le tropisme des vecteurs AAV1 et AAV5 est grandement amélioré et permet notamment à l'AAV5 d'atteindre l'épithélium pigmentaire rétinien. Les vecteurs AAV2, 8 et 9 ne sont par contre que très peu impactés par la porosité de la membrane limitante interne. Car plus que la barrière physique qu'elle représente, c'est la présence de nombreux groupements de protéoglycane héparine-sulfate qui piège ces trois sérotypes. Ainsi, même altérée, la membrane limitante interne freine ces trois sérotypes, alors que l'AAV1 et l'AAV5, qui eux n'ont pas de récepteur à ces mêmes protéoglycane, peuvent diffuser librement.

La déstabilisation de la membrane limitante interne est peut-être une aide à la transduction mais des interrogations subsistent quant à l'absence d'inactivation des protéases qui dégradent cette membrane et donc de leurs potentiels effets indésirables à moyen terme, comme en témoigne cette même étude (Dalkara et al. 2009). On y voit en effet qu'à des concentrations 5 fois plus élevées, l'action de la Pronase E est particulièrement dommageable sur les fonctions ERG avec une baisse de 30 à 40% d'amplitude en seulement 3 semaines. Qu'en serait-il avec la dose normale si on attendait au-delà de trois semaines ? L'étude de *Dalkara et al.* ne le dit pas, mais la question se pose.

Autre barrière anatomique particulièrement étudiée : le corps vitréen dont la composition riche en collagène de type II, en laminine, en fibronectine et en acide hyaluronique lui confère une texture gélatineuse qui pourrait bien piéger une grande partie des vecteurs viraux injectés par cette voie. Ici encore l'utilisation d'enzymes protéolytiques peut permettre de faciliter la diffusion des vecteurs. C'est le cas de l'héparinase III ou de la chondroïtine ABC lyase qui améliorent le tropisme de l'AAV2 pour le transfert de gènes dans les cellules ganglionnaires (Cehajic-Kapetanovic et al. 2011). Et ici encore la question de la toxicité des enzymes à moyen terme se pose.

Un produit contenant une autre enzyme vitréolytique, l'ocriplasmine (JETREA), a déjà été testé chez l'Homme pour le traitement de la traction vitréo-maculaire (Stalmans et al. 2012). L'enzyme constituant ce produit est une sérine protéase capable d'hydrolyser la laminine et la fibronectine présentes dans le corps vitréen. A noter que l'utilisation de l'ocriplasmine n'est pas associée, chez l'Homme, à une plus grande incidence d'effets secondaires sévères par rapport au groupe placebo (eau physiologique) de l'étude citée précédemment. Mais l'utilisation plus fréquente de ce produit en clinique, suite à son autorisation de mise sur le marché en 2013, s'accompagne aussi du report de plusieurs cas de baisse transitoire de l'acuité visuelle suite à son injection dans le vitré (Gomez-Ulla et al. 2015, Tschuppert and Gerding 2016). La question de l'innocuité des protéases à moyen terme

perdre ici aussi. D'autre part, l'utilisation de l'ocriplasmine recombinante humaine (microplasmine) a déjà été décrite pour optimiser le transfert de gènes chez le macaque (Yin et al. 2011), sans que l'on quantifie le gain en transduction, puisque cela n'a pas été l'objet de cette étude.

En résumé, la membrane limitante interne et le corps vitréen sont des barrières anatomiques naturelles limitant la transduction des cellules ganglionnaires et des autres populations cellulaires de la rétine interne par des vecteurs viraux AAV. La déstabilisation de la membrane limitante interne semble surtout améliorer le tropisme des sérotypes 1, 5 et sh10 mais pas vraiment celui des AAV reposant sur des récepteurs à l'héparine sulfate tels que l'AAV2, 8 ou 9 (Dalkara et al. 2009, Vacca et al. 2014). Ainsi, puisque nous avons choisi de lancer notre étude avec l'utilisation de l'AAV2, notre principal obstacle à la transduction des cellules ganglionnaires rétiniennes a été le corps vitréen. En conséquence, nous avons donc aussi réalisé une étude portant sur l'importance du vitrée comme barrière à la transduction chez le gros animal (Tshilenge et al. 2016). Mais contrairement aux équipes qui utilisent des enzymes protéolytiques, nous avons décidé de nous affranchir du vitrée par ponction. Pour maintenir une pression constante dans l'œil malgré l'aspiration du corps vitréen, nous avons échangé le volume du vitrée par une injection d'air. Cette vitrectomie par échange d'air n'a jamais été décrite auparavant pour l'optimisation du transfert de gènes. L'amélioration du taux de transduction est une étape cruciale puisqu'elle pourrait, si elle n'était pas améliorée, limiter l'efficacité du transfert d'optogènes et donc biaiser les résultats portant sur la restauration des fonctions visuelles chez le chien briard déficient pour le gène Rpe65.

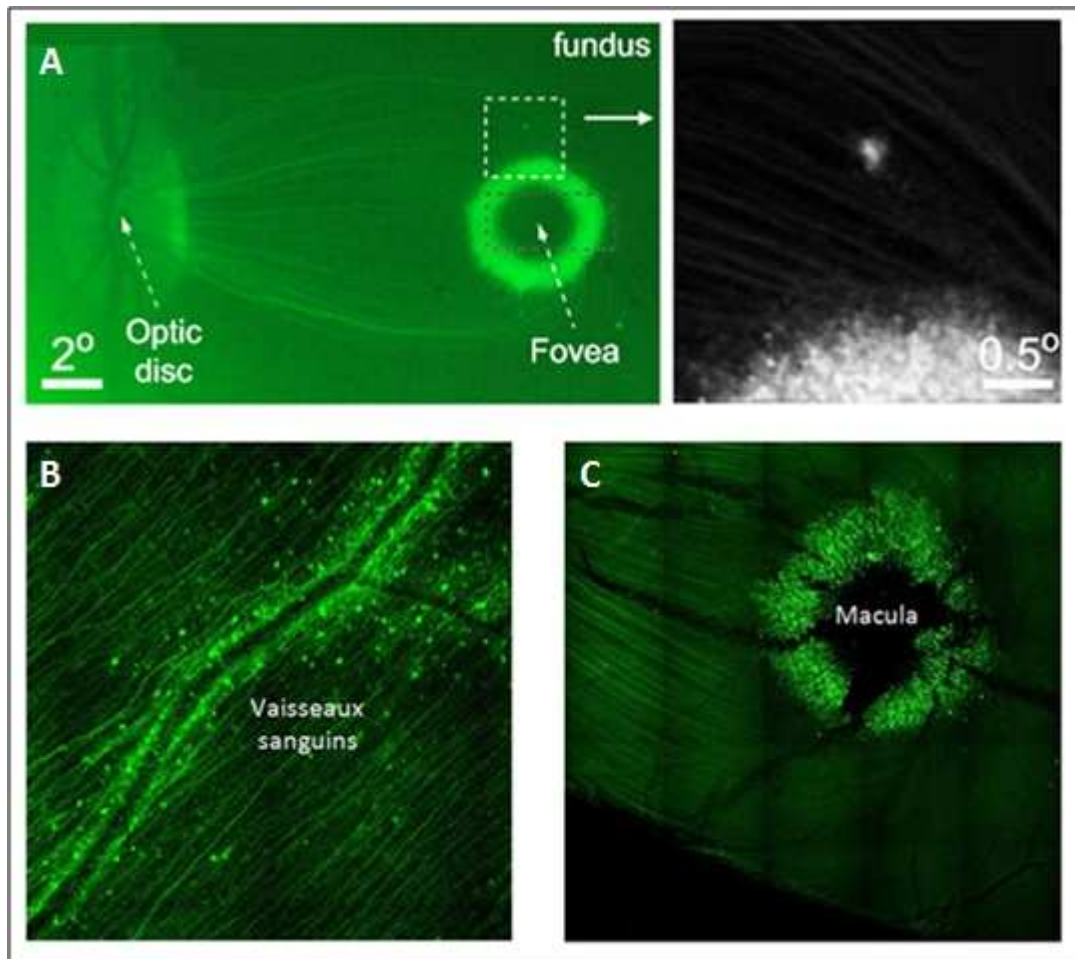


Figure 17: Profil de transduction de vecteurs rAAV2/2.eGFP après injection intravitréenne chez des modèles gros animaux.

(A) Fond d'œil d'une rétine de primate présentant une transduction des cellules ganglionnaires strictement localisées autour de la fovéa et dont les axones projettent vers la papille. L'image zoomée, nous permet de voir qu'en dehors de cette zone parafovéale, les cellules transduites sont extrêmement rares. (D'après : Yin et al., 2011).

(B) Image confocale d'une rétine canine montée à plat et présentant un profil de transduction anormalement fort au niveau des vaisseaux sanguins et des cellules rétinienne environnantes, grossissement x20.

(C) Image confocale d'une rétine de macaque montée à plat dont les cellules transduites sont localisées en zone parafovéale, grossissement x20.

Au cours de cette introduction nous avons pu justifier de la pertinence d'une évaluation du transfert d'optogènes chez des modèles gros animaux de DRH, tel que le chien Rpe65^{-/-}. Le choix des cellules ganglionnaires rétinienne comme cible thérapeutique s'explique par leur survie à long terme et pourrait donc convenir pour des cas de DRH progressives s'accompagnant d'une dégénérescence rétinienne rapide. La réactivation des cellules ganglionnaires en cellules photosensibles, après injection intravitréenne d'un vecteur rAAV contenant un optogène, a été démontrée plusieurs fois chez des modèles rongeurs de DRH. Les optogènes Opn4, ChR2 et eNpHR sont trois des optogènes ayant permis ces preuves de concept. Nous avons souhaité évaluer si le transfert de ces optogènes dans les cellules ganglionnaires de modèles gros animaux tels que le chien permet la restauration de fonction visuelle. Or, chez des modèles gros animaux tels que le chien ou le primate des barrières anatomiques limitent le passage des vecteurs viraux et impliquent donc une intervention chirurgicale différente de celle réalisée chez les rongeurs. Ainsi, nous avons donc décidé d'évaluer l'effet de la vitrectomie sur l'efficacité de transduction des cellules ganglionnaires canines après injection intravitréenne d'un rAAV2/2. Le chien briard déficient pour le gène Rpe65 est un modèle canin de DRH présentant une perte de fonction ERG très précoce associée à une dégénérescence rétinienne lente. Ces deux facteurs sont propices à une première évaluation de l'efficacité du transfert d'optogènes chez un modèle gros animal diurne. C'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer dans ce projet de thèse la restauration des fonctions visuelles du modèle canin Rpe65^{-/-} suite au transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires, après vitrectomie, et par injection intravitréenne d'un rAAV2/2.

Ce projet de thèse se divise en deux parties. Dans une première partie est présenté l'article que nous avons publié récemment (Tshilenge et al. 2016), portant sur l'influence de l'injection intravitréenne après vitrectomie par échange d'air sur le taux de transduction des cellules ganglionnaires chez trois espèces : rats, chiens et primates. L'efficacité de cette approche pour transduire notamment les cellules ganglionnaires canines a permis de réaliser l'étude du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires du modèle canin Rpe65^{-/-}.

Dans la seconde partie seront décrites toutes les étapes *in vitro* qui ont conduit à l'injection du produit thérapeutique chez l'animal. Je détaillerai ensuite les études réalisées chez les modèles sains rongeurs et canins qui ont permis de valider l'expression des transgènes *in vivo*, ainsi que leur innocuité. Enfin, ce manuscrit se terminera sur la description puis la discussion des résultats des différents tests réalisés pour évaluer la restauration des fonctions visuelles chez les chiens Rpe65^{-/-} traités par transfert d'optogènes.

- RESULTATS -

Vitrectomy Before Intravitreal Injection of AAV2/2 Vector Promotes Efficient Transduction of Retinal Ganglion Cells in Dogs and Nonhuman Primates

Kizito-Tshitoko Tshilenge,^{1,†} Baptiste Ameline,^{1,†} Michel Weber,² Alexandra Mendes-Madeira,¹ Steven Nedellec,³ Marine Biget,¹ Nathalie Provost,¹ Lyse Libeau,¹ Véronique Blouin,¹ Jack-Yves Deschamps,⁴ Guylène Le Meur,² Marie-Anne Colle,⁵ Philippe Moullier,^{1,6} Virginie Pichard,^{1,*} and Fabienne Rolling¹

¹Atlantic Gene Therapies, INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France; ²CHU de Nantes, Service d'Ophtalmologie, Nantes, France; ³Cellular and Tissue Imaging Core Facility of Nantes University, SFR Santé François Bonamy INSERM UMS016/CNRS UMS3556, Nantes, France; ⁴Emergency and Critical Care Unit, ONIRIS, and ⁵UMR 703 PAnTher INRA/ONIRIS, Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine Food Science and Engineering, Nantes, France; ⁶Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida.
[†]These two authors contributed equally to this work.

Recombinant adeno-associated virus (AAV) has emerged as a promising vector for retinal gene delivery to restore visual function in certain forms of inherited retinal dystrophies. Several studies in rodent models have shown that intravitreal injection of the AAV2/2 vector is the optimal route for efficient retinal ganglion cell (RGC) transduction. However, translation of these findings to larger species, including humans, is complicated by anatomical differences in the eye, a key difference being the comparatively smaller volume of the vitreous chamber in rodents. Here, we address the role of the vitreous body as a potential barrier to AAV2/2 diffusion and transduction in the RGCs of dogs and macaques, two of the most relevant preclinical models. We intravitreally administered the AAV2/2 vector carrying the CMV-eGFP reporter cassette in dog and macaque eyes, either directly into the vitreous chamber or after complete vitrectomy, a surgical procedure that removes the vitreous body. Our findings suggest that the vitreous body appears to trap the injected vector, thus impairing the diffusion and transduction of AAV2/2 to inner retinal neurons. We show that vitrectomy before intravitreal vector injection is an effective means of overcoming this physical barrier, improving the transduction of RGCs in dog and macaque retinas. These findings support the use of vitrectomy in clinical trials of intravitreal gene transfer techniques targeting inner retinal neurons.

INTRODUCTION

PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES have demonstrated that recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors constitute the most efficient gene delivery vehicle to mediate visual restoration in certain forms of inherited retinal dystrophies (IRDs).^{1–9} The majority of genes mutated in IRDs are expressed in photoreceptors and in the retinal pigmented epithelium, two cell types in which subretinally administered AAVs can successfully induce efficient and long-term transgene expression.^{10,11}

Intravitreal delivery of AAV carrying optogenes (light-sensitive proteins) to transduce retinal gan-

glion cells (RGCs) has recently emerged as an attractive approach to restore retinal light sensitivity in different forms of IRD that are not eligible for gene supplementation.¹² Indeed, it is well documented that RGCs retain their dendritic architecture well after the complete loss of photoreceptors.^{13,14} Exploiting this phenomenon, several studies have demonstrated the feasibility of optogene transfer into RGCs to restore retina light sensitivity in rodent models of IRD.^{15–20} Given that several human genetic diseases have canine equivalents, the optimization and characterization of RGC transduction in the dog retina is a valid approach to develop

*Correspondence: Dr. Virginie Pichard, Atlantic Gene Therapies, INSERM UMR 1089, Institut de Recherche en Santé 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France. E-mail: virginie.pichard@univ-nantes.fr

techniques for the translation of AAV-mediated op-
togenes in the RGCs of IRD patients.^{21,22}

However, AAV-mediated gene transfer into the RGCs in large animal models, such as dogs and nonhuman primates, appears to be less efficient than that in rodents, in which high levels of transduction of RGCs are reached after intravitreal injection of the AAV2/2 vector.^{23–29} Two studies have characterized RGC transduction in canine models after intravitreal injection of the AAV vector. Dudus and coworkers observed a small patch of fluorescing cells in the dog neuroretina after injection of AAV2/2.CMV.GFP into the vitreous body.²³ More recently, Mowat et al. reported that intravitreal injection into the vitreous body of self-complementary AAV2 and capsid-mutant AAV2 expressing GFP under the control of ubiquitous smCBA promoter resulted in weak GFP expression in nerve fibers close to the optic nerve.³⁰

In a study performed in the marmoset, a small New World primate, intravitreal injection of the AAV2/2 vector into the vitreous body resulted in transduction of RGCs in a limited region around the fovea and in the far-peripheral retina. The authors also showed that transduction was not confined to the ganglion cell layer (GCL). Indeed, the vector diffused through the retina to reach outer retinal neurons, including photoreceptors and bipolar cells.³¹ Yin et al. characterized AAV2 transduction in the RGCs of the macaque, a nonhuman primate with an eye size similar to that of humans. Interestingly, those authors found that intravitreal injection of the AAV2 vector with different promoters (ubiquitous or specific), either directly or after enzymatic digestion of the vitreous body, resulted in transduction of RGCs within an annulus around the fovea center, no transduction in the central retina beyond the fovea, and variable RGC transduction in the peripheral retina.³²

This present study was designed to address the role of the vitreous body as a potential barrier to AAV2/2-mediated gene transfer in the RGCs of dogs and macaques, two of the most relevant pre-clinical models. To this end, the AAV2/2 vector was administered intravitreally in dog and macaque eyes either directly into the vitreous chamber or after a complete vitrectomy, a surgical procedure that removes the vitreous body. Our findings suggest that the vitreous body interfered with AAV2/2-mediated transduction to inner retinal neurons by trapping the injected vector, thus impairing its diffusion toward the inner retinal neurons. We show that vitrectomy before vector injection is an effective means of circumventing this physical barrier, and promotes the transduction of RGCs in

dog and nonhuman primate retinas. Because dog and macaque eyes share many anatomical homologies with the human eye, these findings strongly support vitrectomy in human subjects as a valid means to promote AAV2/2-mediated gene transfer to inner retinal neurons.

MATERIALS AND METHODS

Parts of this study were performed under the control of our quality management system, which is approved by Lloyd's Register Quality Assurance to meet the requirements of international Management System Standards ISO 9001:2008. This covers a range of diverse laboratory activities, including research experiments and the production of research-grade viral vectors.

Production of the AAV2/2.CMV.eGFP vector

The SSV9.CMV.egfp plasmid used for the production of AAV2/2.egfp consists of AAV2 inverted terminal repeats, between which the coding sequence for the eGFP complementary DNA is located, flanked by the cytomegalovirus promoter and the simian virus 40 polyadenylation signal. The AAV2/2.egfp vector was produced as previously described³³ at the Vector Core of the University Hospital of Nantes. The titer was determined using dot blot and is expressed as vector genomes (vg) per milliliter (vg/ml).³⁴ The vector titer was 1×10^{12} vg/ml. The vector batch was characterized using a modified replication center assay.³⁵ No infectious adenovirus or rep-positive AAV were detected.

Animals

Four male Sprague Dawley (CD) rats (age at injection, 6 months), four Beagle dogs (3 females, injected at 9 months, 4 years, and 6 years of age, and 1 male, injected at 1.7 years of age), and four nonhuman primates (*Macaca fascicularis*; 3 males, injected at 2 and 4 years of age, and 1 female, injected at 2 years of age) were used in this study (Table 1). The Beagles and nonhuman primates were purchased from the Centre d'Élevage du Domaine des Souches Mezilles, France, and BIOPrim, Baziège, France, respectively. The Sprague Dawley CD rats were acquired from Charles River Laboratory (Domaine des Oncins, France). Animals were maintained at the Boisbonne Center (ONIRIS, Nantes- Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France) on a 12/12 hr light–dark cycle. All experiments involving animals were performed in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the use

Table 1. Details of animals used for experimental procedures

	Vitreous chamber depth (mm)	Vitrectomy before injection	AAV2/2.CMV.eGFP titer (vg/ml)	Injected volume (μ l)	Particle (vg)	Follow-up (dpi)	Analysis
Rat							
R1							Eye fundus, flatmount
R2	1.32 \pm 0.17	—	1 \times 10 ¹²	5	5 \times 10 ⁹	60	Eye fundus, flatmount
R3							Eye fundus, flatmount
R4							Eye fundus, cryosection
R4							Eye fundus, cryosection
Dog							
D1		No					Eye fundus, flatmount, PCR*
D2	10.02 \pm 0.40	No	1 \times 10 ¹²	500	5 \times 10 ¹¹	30	Eye fundus, flatmount, PCR*
D3		Yes		20		Eye fundus, cryosection	
D4		Yes		30		Eye fundus, flatmount	
D4							
Macaque							
M1		No					Eye fundus, flatmount, PCR*
M2	8.63 \pm 0.28	No	1 \times 10 ¹²	400	4 \times 10 ¹¹	60	Eye fundus, flatmount, PCR*
M3		Yes				Eye fundus, flatmount	
M4		Yes		20		Eye fundus, flatmount	
M4		Yes				Eye fundus, flatmount	

Dog, Beagle; dpi, days postinjection; macaque, *Macaca fascicularis*; rat, Sprague Dawley.

*For PCR analysis, viral DNA was extracted from the vitreous body

of animals in ophthalmic and vision research. Injection protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Pays de Loire (France) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (permit number 2012.122). The research was conducted at the Boisbonne Centre (ONIRIS, Nantes) under authorization number H44273, delivered by the Departmental Direction of Veterinary Services (Loire-Atlantique, France), and in accordance with the recommendations of the Weatherall Report for the use of nonhuman primates in research.

Intravitreal administration of the AAV2/2.CMV.eGFP vector

In all three species (rat, dog, and macaque), an identical titer of AAV2/2 vector (1 \times 10¹² vg/ml) was injected and an adequate volume of vector was delivered to cover a large retinal area, determined based on the cargo capacity of the vitreous chamber of each animal species (Table 1). In rats, intravitreal injection was performed in the right eye ($n = 4$). Anesthesia, surgical procedures, and post-surgical care were performed as described earlier.³⁵ Briefly, a transscleral/transchoroidal approach was used, first puncturing the sclera and the choroid. With the aid of an operating microscope, a 33-gauge needle was pushed through the sclera posterior to the corneoscleral limbus and into the vitreous cavity. The total injection volume was 5 μ l, and the total vector dose was 5 \times 10⁹ vg/injection. The accuracy of intravitreal injections was monitored by fluorescence fundus photography immediately after the injection procedure. In dogs and macaques, neutralization assays were performed to ensure that the animals harbored no neutralizing anti-

bodies against the AAV serotype 2 in the serum. In both animal models, the surgical procedure was conducted unilaterally, in the right eye, using a transvitreal approach. In an initial group of both dogs ($n = 2$) and macaques ($n = 2$), a 25-gauge needle was used to inject 500 and 400 μ l of vector solution, respectively, into the vitreous chamber, without removing the vitreous body. In the second group of dogs ($n = 2$) and macaques ($n = 2$), a standard three-port pars plana vitrectomy was performed as previously described.²⁶ Briefly, three 25-gauge sclera ports were inserted in the superior region of the eye close to the limbus to perform the illumination, the removal of the vitreous body, and the infusion. After the vitrectomy, a fluid-air exchange was performed before manual injection of 500 μ l of vector solution with a 25-gauge needle. To preserve retina integrity, the injection and the removal of the needle were performed gently.

In vivo eGFP fluorescence imaging

Native eGFP expression in anesthetized rats, dogs, and macaques was monitored at weekly intervals by fluorescence retinal imaging using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioh Win Software; Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France).³⁵ Identical experimental conditions and parameters were used for fluorescence fundus photography at each time point.

Neuroretinal flat mounts and retinal tissue sections

Retinal flat mounts were prepared identically in rats, dogs, and macaques, as previously described.³⁵ Briefly, the enucleated eyes were fixed

Figure 1. Retinal transduction pattern of AAV2/2.CMV.eGFP after intravitreal injection in rat. **(a)** Eye fundus photographs showing eGFP expression *in vivo* at 60 days postinjection. **(b)** Confocal microscopy image of retinal flat mount showing native eGFP expression in RGCs with axons forming the optic nerve. Arrows and arrowheads indicate RGC axons and optic nerve head, respectively. **(c–h)** Colocalization of native eGFP-expressing RGCs and the neuronal markers NeuN **(c–e)** and TUJ1 **(f–h)**, as shown in confocal images of immunolabeled retinal flat mounts. **(i, j)** Representative retinal sections confirming that RGCs expressing native eGFP are localized in the GCL. eGFP, enhanced green fluorescent protein; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; RGCs, retinal ganglion cells. Scale bars: 200 μm in **(b)**; 50 μm in **(e, h–j)**.

for 2 hr in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) solution before removal of the anterior chamber and the lens. After washing with PBS, the eyes were cut through the pars plana and the anterior segment and lens removed. Eye cups were radially cut into four sections under an operating microscope and flattened. The neuroretina was removed from the RPE-choroid-sclera with fine forceps. The samples were consecutively processed without delay. For retinal tissue sections, fixed neuroretinal flat mounts obtained from rats and dogs were embedded in optimal cutting temperature compound (OCT Cryomount; Microm Microtech, Francheville, France) and snap-frozen in a dry isopentane bath. Cryosections of 12–15 μm thickness were prepared and stored until use.

Immunocytochemistry

For both neuroretinal flat mounts and tissue sections, nonspecific antigen binding was blocked for 2 hr at room temperature in a solution containing 5% normal goat serum (Life Technologies, Saint Aubin, France) and 0.1% Triton X-100 in PBS. The retinas were then incubated overnight at 4°C for 3 days in blocking buffer containing the following primary antibodies at the indicated dilutions: mouse anti- β III-tubulin antibody, 1:1000 (TUJ1; MMS-435P, Covance, NJ); mouse anti-NeuN antibody, 1:250 (ab104224; Abcam, Cambridge, MA). After 3 washes in 0.1% Triton X-100 in PBS, the retinas were incubated for 2 hr at room temperature with Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G secondary antibody (1:250; Life Technologies, Saint Aubin, France) diluted in blocking solution. Cell nuclei were counterstained with DRAQ5 (BioStatus, Leicestershire, UK). After washing in PBS, neuroretinal flat mounts were mounted with Prolong Gold Antifade reagent

(Life Technologies, Saint Aubin, France) and the tissue sections with Antifade medium (Mowiol; Calbiochem, San Diego, CA).

Antibody characterization

NeuN antibody. The monoclonal antibody NeuN labels a neuronal-specific nuclear protein. This antibody specifically recognizes the nuclei of most neuronal cell types in the adult mammalian brain.³⁶ In mouse and pig retina, NeuN antibody immunostains RGCs and amacrine cells.^{37,38}

TUJ1 antibody. The monoclonal antibody TUJ1 recognizes β III-tubulin, a neuron-specific cytoskeletal protein. In the retina, several studies have shown that TUJ1 antibody immunostains the cytoskeleton of medium and large RGCs, as well as the somata, dendrites, and axons.^{39,40}

Fluorescent image acquisition with confocal microscopy

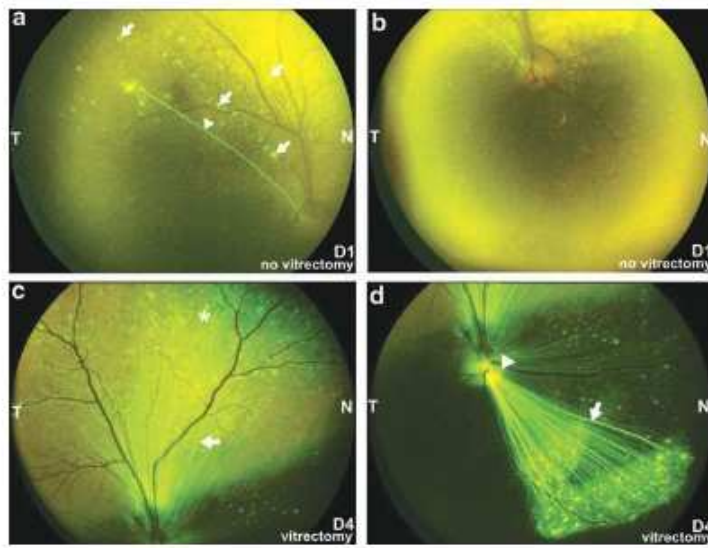
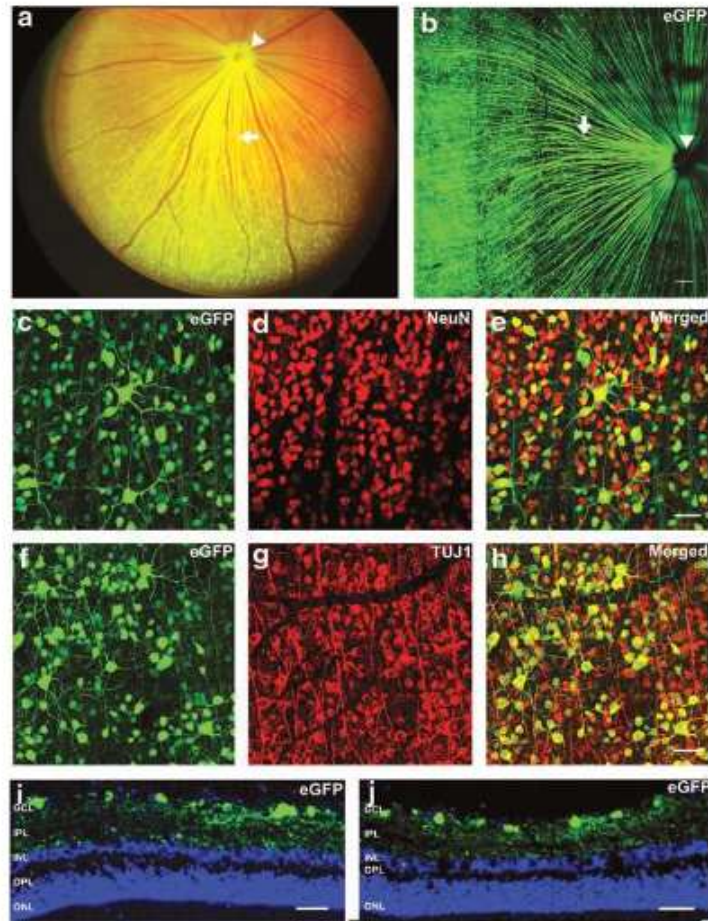
Neuroretinal flat mounts and tissue sections were examined using a laser scanning confocal microscope (Nikon A1RSi). Three-dimensional digital images were collected at 20 \times (NA 0.75) and 60 \times (NA 1.4) using NIS elements confocal software and appropriate fluorescence filters (488, 561, and 647 nm). The image scale was calibrated, and where necessary brightness and contrast were adjusted using Fiji software.

RESULTS

Efficient transduction of RGCs in the rat retina

We explored the feasibility of intravitreal injection of AAV2/2.CMV.eGFP (10¹² vg/ml, 5 μl) in adult wild-type rats ($n=4$) to enable gene delivery into RGCs (Table 1). Fluorescence fundus photography in live rats revealed enhanced green fluo-

Figure 2. Retinal transduction pattern of AAV2/2.CMV.eGFP in dog eyes after intravitreal injection either directly into the vitreous body or after vitrectomy. **(a, b)** After direct injection into the vitreous body, eGFP expression was evaluated by fundus photography up to 30 days postinjection (dpi). In the superior retina, eGFP expression was detected in few axon (arrowhead), and sparse foci were observed, located mainly along blood vessels (arrows). No eGFP expression was detected in the inferior retina. **(c, d)** In eyes injected after vitrectomy, fundus photography revealed extensive eGFP expression in RGC axons projecting toward the optic nerve head, and in both the central retina and the far peripheral retina at 25 dpi. Arrows and arrowheads indicate RGC axons and the optic nerve head, respectively. *, region of retina analyzed in retinal flat mounts on Fig. 3; N, nasal retina; T, temporal retina. Note: The reflection observed in central part of the images corresponds to the flashlight during the acquisition with the camera of fluorescence retinal imaging.



rescent protein (eGFP) expression across the entire retina at 60 days postinjection (dpi) (Fig. 1a). The retinal transduction pattern was characterized by extensive eGFP expression both in axons in the peripheral retina (arrows in Fig. 1a) and along the axons projecting toward the optic nerve head (arrowheads in Fig. 1a). We noted that eGFP-expressing RGCs were mainly localized in the peripheral retina, with few close to the optic nerve (Fig. 1a). These observations were confirmed by confocal analysis of transduced retinal flat mounts, in which a high density of RGCs was observed in the peripheral retina (Fig. 1b). The low density of transduced RGCs close to the optic nerve may be because of the thickness of the nerve fiber layer (NFL). Indeed, the NFL is thicker close to optic nerve and may limit AAV vector diffusion to RGCs. In transverse retinal sections (Fig. 1i and j) we observed that eGFP expression was confined to the cell bodies of the GCL.

To characterize the transduced RGCs, immunocytochemistry was performed on rat retinal flat mounts using the neurochemical markers NeuN and TUJ1 to immunostain RGCs. NeuN immunoreactivity was localized in the cytoplasm and nucleus of numerous cells of the GCL (Fig. 1d), and TUJ1 labeling was observed in the cytoplasm, dendrites, and particularly along the axons of RGCs (Fig. 1g). Interestingly, the GFP signal co-localized with both NeuN and TUJ1 immunostaining (Fig. 1e and h). In transverse retinal sections, we analyzed the expression of GABA, a neuronal marker of amacrine cells. We observed two narrow strata in the inner plexiform layer consisting of the dendrites of amacrine cells, but no labeling of cell bodies in either the GCL or the inner nuclear layer (data not shown). We did not observe co-localization of eGFP-expressing cell bodies and GABA staining. However, we cannot rule out the possibility that some displaced amacrine cells may have expressed eGFP. Because RGCs are the sole output neurons of the retina and their axons travel through the optic nerve head, our results demonstrate that AAV2/2 was capable of mediating efficient gene transfer in RGCs. Indeed, the presence of eGFP expression along axons indicates transduction of RGCs and anterograde axonal transport of eGFP.

Transduction in retinal flat mounts was quantitatively assessed in the peripheral retina, where eGFP-expressing RGCs were mainly localized. The density of the transduced cells was calculated at 855 ± 91 cells/mm² (Supplementary Fig. S1b; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/hgtb). We next evaluated transduction efficiency using TUJ1, the expression of which

was predominantly observed in RGC axons, one of the criteria used to distinguish RGCs from displaced amacrine cells. We found that $65\% \pm 4\%$ of TUJ1-positive cells expressed native eGFP (Supplementary Fig. S1c). These results demonstrate that the AAV2/2 vector was able to efficiently transduce RGCs in rat eyes after intravitreal injection.

The vitreous body is a barrier to AAV2/2 transduction to inner retinal neurons in the dog and macaque

Because the vitreous body occupies considerable space in the eyes of large animal models such as the dog and macaque, we investigated the effect of the vitreous body on vector transduction. To this end, AAV2/2.CMV.eGFP (10^{12} vg/ml) was administered intravitreally into the vitreous body of two dogs (D1 and D2, 500 μ l) and two macaques (M1 and M2, 400 μ l) (Table 1) that had previously tested negative for serum-neutralizing factors against AAV2. In dog D1, few GFP-positive axons were observed in the superior retina (arrowhead in Fig. 2a) and none in the inferior retina. We also observed sparse, small foci of eGFP expression, mainly located along blood vessels in superior retina (arrows in Fig. 2a). In the inferior retina, no eGFP foci were detected (Fig. 2b). In dog D2 (data not shown) and in macaques (M1 and M2), eGFP expression was undetectable by fundus photography in both the central and peripheral retina (Fig. 5a and b). Confocal microscopy identified small foci of eGFP expression along the blood vessels in retinal flat mounts from dog D1 (Supplementary Fig. S2) and the total absence of eGFP expression in retinal flat mounts corresponding to dog D2 and to both macaques (M1 and M2) (data not shown). By contrast, vector genomes were detected using PCR in DNA extracts from the vitreous body of both dogs (D1 and D2) and both macaques (M1 and M2) (Supplementary Fig. S3). Taken together, these results suggest that, in larger animal models, which possess a prominent vitreous cavity, the vitreous body constitutes a physical barrier by trapping the AAV2/2 vector intravitreally administered, which in turn limits its retinal transduction ability.

Vitrectomy in dogs allows efficient transduction of RGCs in both tapetal and nontapetal regions of the retina

To promote AAV2/2 vector diffusion toward inner retinal neurons and thereby its transduction into RGCs, we performed vitrectomies in two dogs (D3 and D4; Table 1) before intravitreal injection of AAV2/2.CMV.eGFP (10^{12} vg/ml, 500 μ l). Fluores-

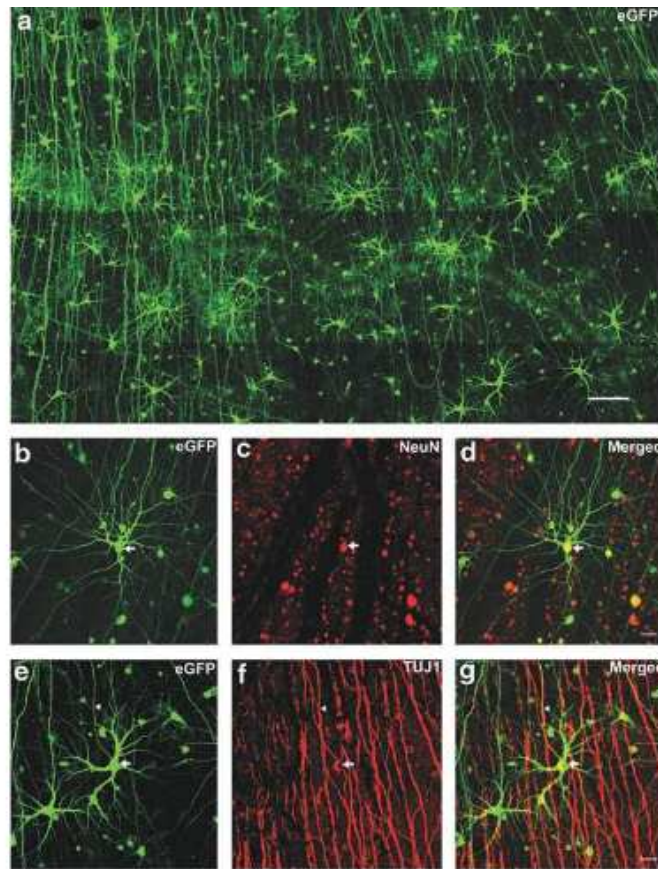


Figure 3. Representative retinal flat mounts from dog D4 injected with AAV2/2.CMV.eGFP vector after vitrectomy. **(a)** Confocal microscopy image of retinal flat mount from superior retina (asterisk in Fig. 2c) showing native eGFP expression in RGCs with somata and axons forming the optic nerve. Colocalization of native eGFP-expressing RGCs and the neuronal markers NeuN **(b-d)** and TUJ1 **(e-g)** was evident in confocal images of immunolabeled retinal flat mounts. Arrows and arrowheads indicate somata and axons, respectively. Scale bars: 200 μm in **(a)**; 50 μm in **(d, g)**.

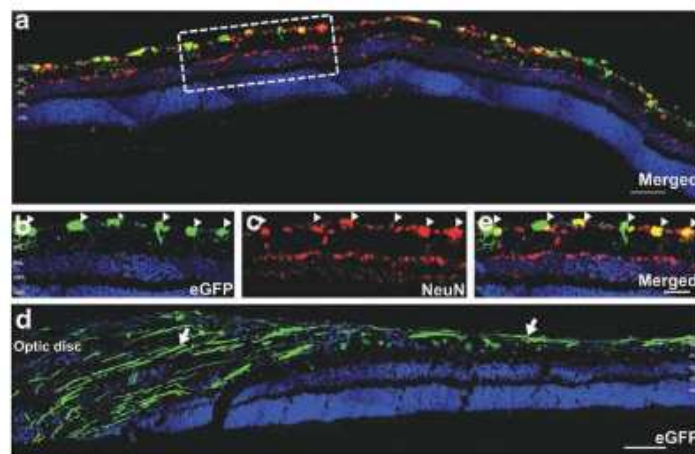


Figure 4. Representative retinal sections from dog D3 injected with AAV2/2.CMV.eGFP vector after vitrectomy. **(a-d)** In RGCs located in the GCL, native eGFP co-localizes with the neuronal marker NeuN (arrowheads), as seen in confocal images of immunolabeled retinal sections. A higher magnification of the dotted square in **(a)** is shown in **(b-d)**. **(e)** Native eGFP-expressing RGCs project their axons toward the optic nerve (arrows). eGFP, enhanced green fluorescent protein; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; NFL, nerve fiber layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 100 μm in **(a, e)**; 50 μm in **(d)**.

Figure 5. Retinal transduction pattern of AAV2/2.CMV.eGFP in macaque eyes after intravitreal injection either directly into vitreous body or after vitrectomy. **(a, b)** After direct injection into the vitreous body, fundus photography up to 60 dpi revealed no eGFP expression in either the central or peripheral retina. **(c, d)** In eyes injected after vitrectomy, fundus photography revealed extensive eGFP expression at 20 dpi, with highest levels observed in the peripheral retina in RGCs axons projecting toward the optic nerve head, and lowest levels in the central retina, except for an annulus of transduction around the fovea (dotted square in **a**). Arrows and arrowheads indicate RGC axons and optic nerve head, respectively. *, region of retina analyzed in retinal flat mounts on Fig. 6; N, nasal retina; T, temporal retina. Note: The reflection observed in central part of the images corresponds to the flashlight during the acquisition with the camera of fluorescence retinal imaging.

cence fundus photography in live dogs revealed high levels of eGFP expression in the central retina and in the peripheral retina at 25 dpi (Fig. 2c and d), in contrast to dogs that received injections directly into the vitreous body (Fig. 2a and b). In the superior retina, we observed a homogenous transduction pattern in both the central and the peripheral retina, with eGFP expression along axons projecting toward the optic nerve head (arrows in Fig. 2c). The transduction pattern in the inferior retina was heterogeneous: the inferior nasal retina exhibited extensive axonal expression of eGFP (arrows in Fig. 2d), whereas no eGFP expression was detected in the axons of the inferior temporal retina (Fig. 2d). Confocal microscopy of transduced regions in superior retina of dog D4 (asterisk in Fig. 2c) revealed in retinal flat mounts that eGFP expression was localized in the RGCs, characterized by a soma with the axon and dendritic arborization oriented toward the optic nerve head (Fig. 3a).

Immunohistochemistry of transduced regions of the superior and inferior retina revealed that NeuN immunoreactivity co-localized with native eGFP expression in RGCs (Fig. 3c and d). TUJ1 immunoreactivity was observed in the cytoplasm, dendrites, and axons of numerous RGCs expressing native eGFP (Fig. 3f and g). The morphology of eGFP-expressing RGCs was also analyzed in the superior retina, in which a homogeneous transduction pattern was observed. In the dogs studied, the RGCs were large-sized cells with substantially larger soma and dendritic tree diameters than those seen in rat RGCs (Supplementary Fig. S1a). The transduced cell density in the dog retina was 82 ± 10 cells/mm², which was lower than that observed in rats (Supplementary Fig. S1b). Using TUJ1 labeling to quantitatively evaluate transduction efficiency in RGCs in transduced regions of the superior retina in retinal flat mounts, we found that the AAV2/2 vector transduced $16\% \pm 1\%$ of

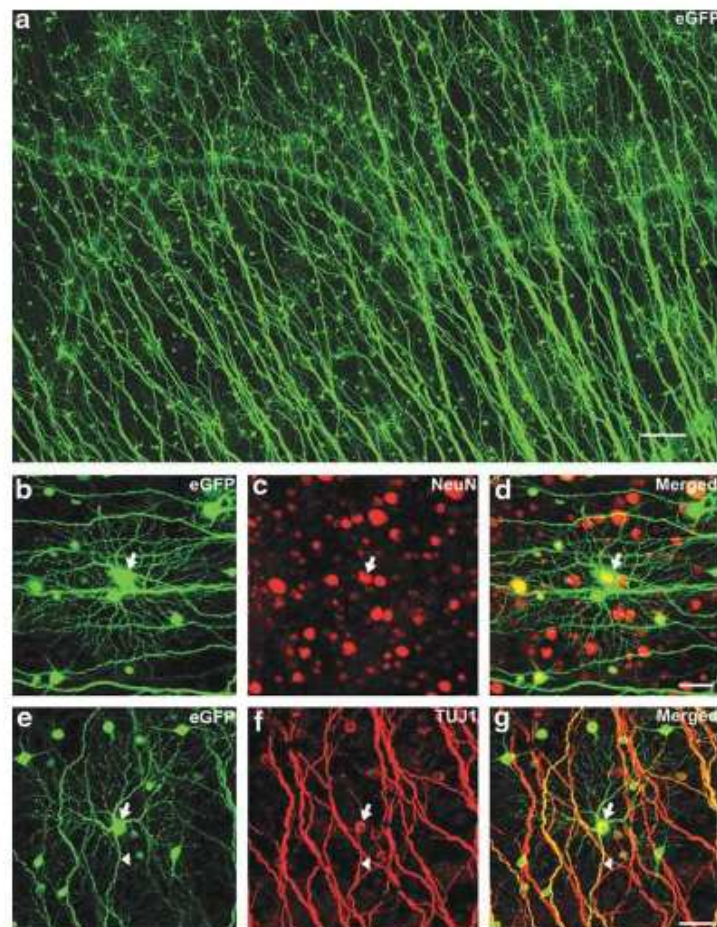
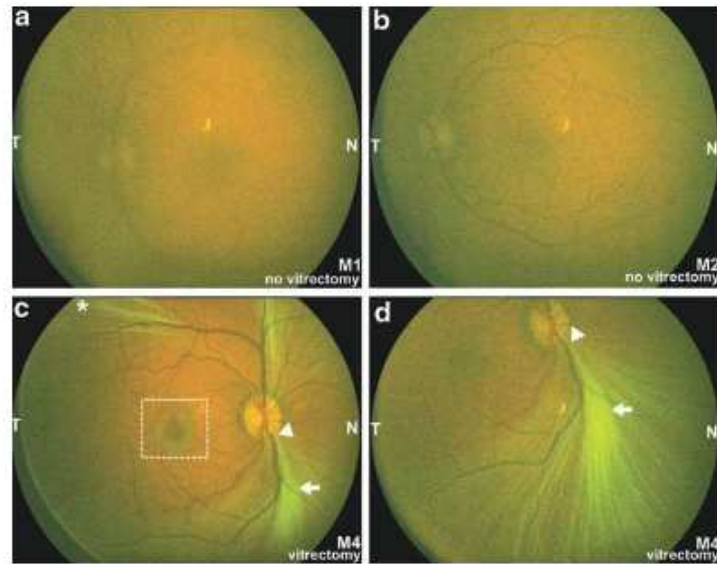
TUJ1-positive cells after intravitreal injection (Supplementary Fig. S1c).

Finally, analysis of retinal transverse sections through the transduced regions of the retina of dog D3 confirmed that AAV2/2 drove efficient gene transfer in dog RGCs. First, native eGFP expression was restricted to RGCs (Fig. 4a and b). Second, the dendrites of native eGFP-expressing somata extended throughout the IPL (Fig. 4a and b). Third, in retinal sections close to the optic nerve head, eGFP expression was localized in the axons of the NFL (Fig. 4e). Finally, co-localization of the neuronal markers NeuN (Fig. 4a–d) and TUJ1 was observed in native eGFP-expressing somata (data not shown).

Vitrectomy in macaques allows efficient transduction of RGCs localized in the peripheral retina and in an annulus around the fovea

In nonhuman primates (*Macaca fascicularis*, $n=2$), we further explored the ability of the vitrectomy procedure to promote AAV2/2-mediated gene delivery to RGCs considering the fovea-macular region. Two macaques (M3 and M4; Table 1) received intravitreal injections of AAV2/2.CMV.eGFP (10^{12} vg/ml, 500 μ l) after vitrectomy. Fluorescence retinal imaging in live macaques revealed high levels of eGFP expression at 20 dpi (Fig. 5c and d), in contrast to macaques that received injections directly into the vitreous body (Fig. 5a and b). Highest levels of transduction were observed in the peripheral retina and lowest in the central retina (Fig. 5c and d), except for an annulus of transduction around the fovea (dotted square in Fig. 6c and Supplementary Fig. S4). Notably, both the superior and inferior peripheral retinas showed homogeneous transduction of RGCs with the AAV2/2 vector. In line with our observations in the rat and dog, the pattern of retinal transduction in macaque retinas was characterized by extensive

Figure 6. Representative retinal flat mounts from macaque M4 injected with AAV2/2.CMV.eGFP vector after vitrectomy. **(a)** Confocal microscopy image of retinal flat mount from superior retina (asterisk in Fig. 5c) showing native eGFP expression in RGCs with somata and axons forming the optic nerve. In RGCs native eGFP expression colocalizes with that of the neuronal markers NeuN **(b–d)** and TUJ1 **(e–g)**, as shown in confocal images of immunolabeled retinal flat mounts. Arrows and arrowheads indicate somata and axons, respectively. Scale bars: 200 μ m in **(a)**; 50 μ m in **(d, g)**.



eGFP expression along axons projecting toward the optic nerve head (arrows and arrowheads in Fig. 5c and d). Interestingly, live fluorescence retinal imaging revealed a less intense eGFP signal in macaques compared with AAV2/2-injected dogs. We hypothesize that the strongly pigmented retinal pigmented epithelium cells in macaques cause partial fluorescence quenching. Confocal microscopy of transduced regions in the superior retina of macaque M4 (asterisk in Fig. 5c) revealed eGFP expression in a number of RGCs in retinal flat mounts (Fig. 6a).

Further immunohistochemistry of transduced regions of the superior and inferior retina showed that (1) NeuN and TUJ1 expression was confined to cells of the GCL (Fig. 6c and f), and (2) both neuronal markers were expressed in RGCs expressing native eGFP (Fig. 6d and g). In transduced regions of the superior retina of macaques, RGCs were small cells with smaller dendritic fields than those observed in dog retinas (Supplementary Fig. S1a). Furthermore, the density of transduced cells in macaque retinas (173 ± 10 cells/mm²) was higher than that seen in dog retinas (Supplementary Fig. S1b). Finally, we estimated that in the transduced regions of superior retinas $42\% \pm 6\%$ of TUJ1-positive cells expressed native eGFP (Supplementary Fig. S1c). These results demonstrate that the AAV2/2 vector efficiently transduced RGCs in macaque retinas after intravitreal injection.

DISCUSSION

We performed a side-by-side analysis of AAV2/2-mediated gene transfer in the RGCs of rat, dog, and macaque retinas after intravitreal injection. The transduction of RGCs in rat retinas was consistent with previous data,²⁸ further supporting the rat as a valid and useful animal model in which to assess the ability of intravitreally administered AAV2/2 to effectively transduce inner retinal neurons. By contrast, direct injection of the AAV2/2 vector into the vitreous body in dog and macaque retinas failed to induce eGFP expression, or at most resulted in sporadic expression along the blood vessels.

The marked differences in eGFP expression between rats and larger animal models after vector administration may be attributable to anatomical differences in the eye, in particular the larger vitreous chamber volume in dogs and macaques. The vitreous body is a gel-like structure, composed mainly of collagen and glycosaminoglycan,^{41,42} through which intravitreally injected vector must diffuse before reaching the inner retinal neurons

and eventually transducing RGCs. In rats, the volume of the vitreous chamber is relatively small; indeed the lens occupies a large portion of the vitreous cavity. We hypothesize that the injected vector is less trapped in the vitreous body; in turn a large proportion of viral vector diffuses toward the GCL to mediate gene transfer in RGCs across the retina. In dogs and macaques, the larger vitreous body may act as a physical barrier to AAV2/2-mediated transduction to inner retinal neurons: the injected vector is trapped in the large vitreous body, impairing its diffusion toward the inner retinal neurons. This hypothesis, which could also be applied to other AAV serotypes, is supported by two key findings: first, AAV vector genomes were detected within the vitreous body; second, vitrectomy before vector injection markedly improved the transduction of RGCs in dog and macaque retinas. Indeed, we observed substantial eGFP expression in numerous RGC axons projecting toward the optic nerve head, indicating efficient transduction of RGCs. Vitrectomy thus appears to be an effective means of overcoming vector blockade by the vitreous body. Vitrectomy may offer an additional advantage in that it allows the injection of a large volume of vector solution to make direct contact with a large area of the retinal surface, potentially resulting in a higher multiplicity of infection at retina level. Moreover, we did not observe signs of inflammation based on the ophthalmic examinations, including fundus photography and optical coherence tomography. Taken together, our results indicate that the type 2 AAV capsid is capable of mediating efficient and strong transduction of RGCs in rodent, canine, and nonhuman primate models.

Previous study in which nonconventional AAV2 vectors (self-complementary and capsid-mutant) have been injected into dog eyes reported only weak GFP expression by 14 dpi, using a ubiquitous promoter.³⁰ By 28 dpi, GFP expression was limited to the nerve fibers close to the optic nerve head, and localized around large retinal blood vessels. The greater efficiency of RGC transduction described in the present study may be attributable to the contrasting vector injection methods used in the two studies. Indeed, Mowat et al.³⁰ did not report using any specific approach to overcome the blocking effect of the vitreous body before intravitreal injection. In our study, in dogs that underwent vitrectomy we observed a homogeneous pattern of RGC transduction in the superior retina, and a heterogeneous transduction pattern in the inferior retina. The inferior nasal retina was highly transduced compared with the inferior temporal retina.

This heterogeneous transduction pattern may be because of the factors such as (1) a partial vitrectomy in inferior temporal retina as compared with the inferior nasal retina, (2) the detachment of hyaloid membrane induced by the vitrectomy, probably more effective in inferior nasal retina, and/or (3) the injection volume used, which was probably insufficient to spread throughout the entire retina. A recent study reported that vitrectomy before intravitreal delivery of capsid-mutant AAV2 vector does not enhance inner retinal transduction in the dog.⁴³ The high levels of RGCs transduction obtained in our study compared with Boyd et al. study⁴³ may be because of (1) the vitrectomy procedure; in the present study, AAV2 vector was injected immediately after a fluid–air exchange to promote a direct interaction between the vector and the retina, whereas Boyd et al. have injected triamcinolone crystals to facilitate the vitrectomy and the vector was injected one month after the vitrectomy in balanced salt solution; and/or differences in (2) the viral serotype/titer and (3) the injection volume. Overall, our findings show that successful gene transfer in RGCs of large animal models is dependent on a combination of factors, including (1) route of administration, (2) vitrectomy procedure before vector injection, (3) AAV serotype, (4) the titer and volume of injected vector, and (5) the promoters used.

The viral tropism we observed in the central retina of macaques that underwent vitrectomy was consistent with that described in two previous studies,^{31,32} confirming the ability of AAV2/2 to efficiently transduce RGCs around the fovea-macular region, but not those in the central retina, beyond the fovea. Vitrectomy before vector injection significantly promoted transduction of RGCs in the peripheral retina of the macaque. Yin et al. previously showed that intravitreal injection of AAV2 vector in macaques using either ubiquitous or specific promoters results in sparse transduction of RGCs in the peripheral retina.³² The differing levels of transduction in peripheral retina obtained in that study with respect to ours may be because of (1) the method of injection selected (we removed the vitreous body by vitrectomy before injection, whereas Yin et al. used the microplasmin enzyme to induce vitreoretinal detachment), and/or differences in (2) the viral titer and (3) the injection volume.

Interestingly, compared with transduced rat and dog retinas, in which AAV2/2 transduction in RGCs was localized in the central and peripheral retina, transduction of RGCs in the central retina of macaques was largely absent, except for an islet of transduction around the fovea. A previous

study in macaque retina reported that an “evolved” AAV variant (7m8), capable of transducing RGCs around the fovea and in peripheral retina, produces variable RGCs transduction in the central retina beyond the fovea.⁴⁴ We suggest that the lack of RGC transduction observed in the central retina may reflect a lack of specific receptors or the existence of physical barriers in the nonhuman primate retina that may not be present in rats and dogs. We hypothesize that the combination of two factors, the inner limiting membrane (ILM) and the NFL, may influence the ability of the AAV2/2 to transduce RGCs in the central retina in nonhuman primates. Indeed, the pattern of AAV2/2 transduction in the macaque retina was consistent with the varying thickness of the ILM and NFL across the retina. Anatomically, the ILM and NFL are thinner around the fovea-macular region and in the peripheral retina, two sites in which we observed efficient RGCs transduction.^{45,46} Conversely, no RGC transduction was observed in the central retina outside the fovea where the ILM and NFL are thickest.^{45,46} Thus, in the macaque eye, vitrectomy before intravitreal injection of AAV2/2 vector promotes RGC transduction around the fovea-macular region and in the peripheral retina. However, further studies will be required to better characterize the low level of transduction seen in the central retina in order to improve RGC transduction in this region, which contains high density of RGCs.

In conclusion, our findings demonstrate that the vitreous body constitutes a physical barrier to gene transfer to inner retinal neurons in the dog and macaque—two commonly used large animal models. We show that vitrectomy before intravitreal injection of AAV2/2 vector results in efficient transduction of RGCs in both animal models. These results could facilitate significant improvements in gene therapy strategies that target RGCs (e.g., for the treatment of Leber hereditary optic neuropathy) and in alternative approaches to vision restoration, including optogene transfer in RGCs. Moreover, removal of the physical barrier of the vitreous body before vector delivery may constitute a valid approach to enhance the weak photoreceptor transduction generally observed after intravitreal vector administration. In summary, these findings support the use of vitrectomy in clinical trials involving intravitreal gene transfer in inner retinal neurons.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Vector Core for producing the rAAV vectors, the staff of the Boisbonne Center for

animal husbandry, and Mireille Ledevin (INRA/ONIRIS, Nantes, France) for retinal cryosections. We also thank Philippe Hulin (Cellular and Tissue Imaging Core Facility, INSERM, Nantes, France), Frédéric Broucque, and Johanne L.E. Duff (Atlantic Gene Therapies, INSERM UMR 1089) for their technical assistance. This work was sup-

ported by unrestricted grants from the Association Française contre les Myopathies, the INSERM, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire, and the Agence Nationale pour la Recherche.

AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Le Meur G, Steiger K, Smith AJ, et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007; 14:292–303.
2. Komaromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, et al. Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 2010; 19:2581–2593.
3. Beltran WA, Cideciyan AV, Lewin AS, et al. Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:2132–2137.
4. Petit L, Lheriteau E, Weber M, et al. Restoration of vision in the pde6beta-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. *Mol Ther* 2012; 20:2019–2030.
5. Lheriteau E, Petit L, Weber M, et al. Successful gene therapy in the RGRIP1-deficient dog: A large model of cone-rod dystrophy. *Mol Ther* 2014; 22: 265–277.
6. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2231–2239.
7. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358:2240–2248.
8. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: Short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 979–990.
9. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: Initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014; 383:1129–1137.
10. Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, et al. Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 591–594.
11. Bennett J, Maguire AM, Cideciyan AV, et al. Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9920–9925.
12. Busskamp V, Picaud S, Sahel JA, et al. Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene Ther* 2012; 19:169–175.
13. Mazzoni F, Novelli E, Strettoi E. Retinal ganglion cells survive and maintain normal dendritic morphology in a mouse model of inherited photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 2008; 28:14282–14292.
14. Lin B, Peng EB. Retinal ganglion cells are resistant to photoreceptor loss in retinal degeneration. *PLoS One* 2013; 8:e68084.
15. Bi A, Cui J, Ma YP, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 2006; 50:23–33.
16. Tomita H, Sugano E, Yawo H, et al. Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelrhodopsin-2 gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:3821–3826.
17. Lin B, Koizumi A, Tanaka N, et al. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16009–16014.
18. Zhang Y, Ivanova E, Bi A, et al. Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 2009; 29:9186–9196.
19. Tomita H, Sugano E, Isago H, et al. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res* 2010; 90:429–436.
20. Tomita H, Sugano E, Murayama N, et al. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1. *Mol Ther* 2014; 22:1434–1440.
21. Beltran WA. The use of canine models of inherited retinal degeneration to test novel therapeutic approaches. *Vet Ophthalmol* 2009; 12:192–204.
22. Miyadera K, Acland GM, Aguirre GD. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: The power of within- and across-breed studies. *Mammal Genome* 2012; 23:40–61.
23. Dudas L, Anand V, Acland GM, et al. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intracocular injection of rAAV. *Vis Res* 1999; 39:2545–2553.
24. Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, et al. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2001; 4:461–472.
25. Folliot S, Briot D, Conrath H, et al. Sustained tetracycline-regulated transgene expression *in vivo* in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med* 2003; 5:493–501.
26. Provost N, Le Meur G, Weber M, et al. Biodistribution of rAAV vectors following intracocular administration: Evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* 2005; 11:275–283.
27. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther* 2009; 17:463–471.
28. Hellstrom M, Ruitenberg MJ, Pollett MA, et al. Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Ther* 2009; 16:521–532.
29. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 2011; 19:293–301.
30. Mowat FM, Gornik KR, Dinculescu A, et al. Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach. *Gene Ther* 2014; 21:96–105.
31. Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, et al. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:5298–5296.
32. Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, et al. Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:2775–2783.

33. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002;76:791–801.
34. Salvetti A, Dreve S, Chadeuf G, et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 1998;9:695–706.
35. Duisit G, Conrath H, Saleun S, et al. Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol Ther* 2002;6:446–454.
36. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992;116:201–211.
37. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, et al. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2008;28:2735–2744.
38. Johansson UE, Eftekhari S, Warfvinge K. A battery of cell- and structure-specific markers for the adult porcine retina. *J Histochem Cytochem* 2010;58:377–389.
39. Cui Q, Yip HK, Zhao RC, et al. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:49–61.
40. Huang C, Cen LP, Liu L, et al. Adeno-associated virus-mediated expression of growth-associated protein-43 aggravates retinal ganglion cell death in experimental chronic glaucomatous injury. *Mol Vis* 2013;19:1422–1432.
41. Bishop P. The biochemical structure of mammalian vitreous. *Eye* 1995;10:664–670.
42. Kleinberg TT, Tzekov RT, Stein L, et al. Vitreous substitutes: A comprehensive review. *Surv Ophthalmol* 2011;56:300–323.
43. Boyd RF, Boye SL, Conlon TJ, et al. Reduced retinal transduction and enhanced transgene-directed immunogenicity with intravitreal delivery of rAAV following posterior vitrectomy in dogs. *Gene Ther* 2016.
44. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, et al. *In vivo*-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 2013;5:189ra176.
45. Matsumoto B, Blanks JC, Ryan SJ. Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:71–82.
46. Frenkel S, Morgan JE, Blumenthal EZ. Histological measurement of retinal nerve fibre layer thickness. *Eye* 2005;19:491–498.

Received for publication March 13, 2016;
accepted after revision May 25, 2016.

Published online: May 26, 2016.

Supplementary Data

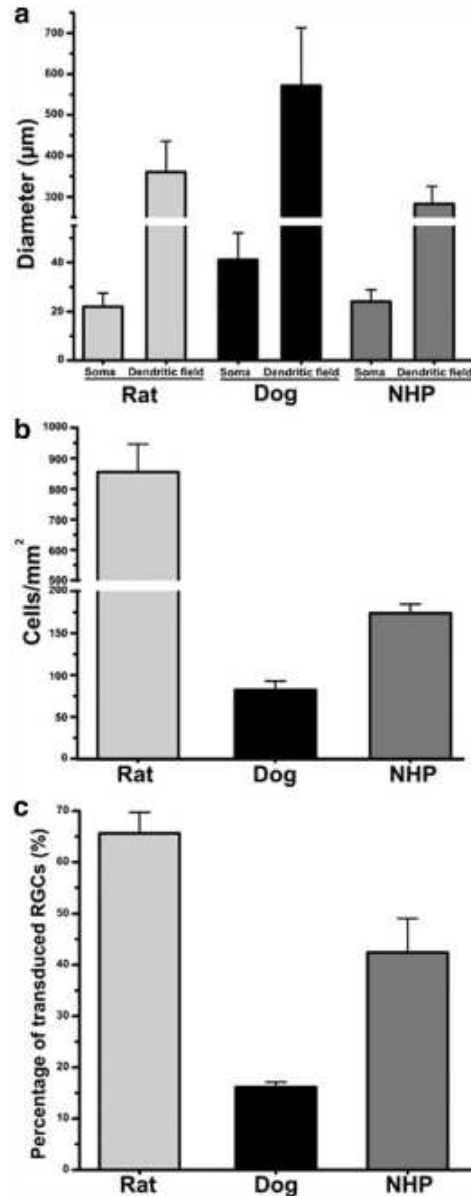
SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Quantitative and statistical analysis

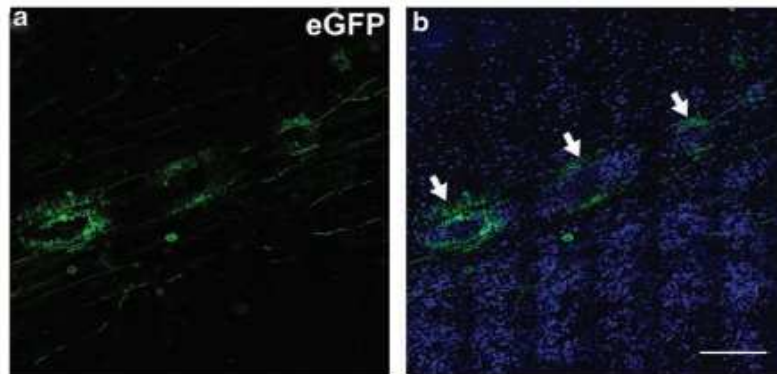
Confocal digital images of the ganglion cell layer were captured from transduced regions in retinal flat mounts; retinal fields were measured in $480\ \mu\text{m} \times 480\ \mu\text{m}$ squares and viewed at $60\times$. For quantification analysis in rat retinal flat mounts, retinal fields ($n=8$) were selected in transduced regions, mainly in the peripheral retina, as fundus photography revealed a high density of eGFP-expressing RGCs in this region. For quantification analysis in dog retinal flat mounts, retinal fields ($n=32$) were selected in transduced regions of the superior retina, in which fundus photography revealed homogeneous transduction. In macaque retinas, in which fundus photography showed homogeneous transduction in both the superior and inferior peripheral retina, retinal fields ($n=32$) were selected in transduced regions of the superior retina. To quantify the diameter of the RGC somata, a circle was fitted to the soma and its diameter measured using the object area and Feret diameter tools in Fiji software. For dendritic field size, a convex polygon was drawn by linking the tips of the dendrites, and the area calculated. The Feret diameter was calculated as the longest distance between any two points on an object's perimeter, also known as the maximum caliper. The somata and dendritic field dimensions were calculated by converting the pixel dimensions of an object to the micrometer scale dimensions of the image. The number and density (cells/ mm^2) of native eGFP-expressing cells and TUJ1-positive cells were manually determined using the cell counter plugin from Fiji. The percentage of transduced cells was determined as the total number of native eGFP-expressing cells divided by the total number of TUJ1-positive cells. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) using Welch's *t*-test. The difference was considered statistically significant if the *p*-value was less than 0.05. In all figures, graphs represent the mean \pm SD.

Collection of vitreous body and AAV DNA extraction

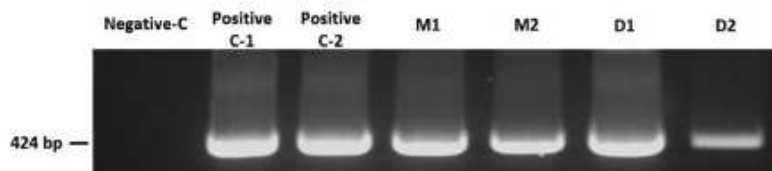
Dogs (D1 and D2) and macaques (M1 and M2) were sacrificed at 30 and 60 days postinjection, respectively (Table 1), and vitreous body was col-



Supplementary Figure S1. Characterization of transduction efficiency in retinal ganglion cells of rat, dog, and macaque. **(a)** Somata and dendritic field sizes of transduced RGCs in rat, dog, and macaque. Histograms illustrate the mean of somata and dendritic field diameters. A significant difference was observed in soma and dendritic field diameters of rat, dog, and macaque ($p < 0.05$, Welch's *t*-test). **(b)** Histograms illustrate the average densities of transduced cells in rat, dog, and macaque retinas. **(c)** Transduction efficiency of the AAV2/2 vector after intravitreal injection in rat, dog, and macaque eyes. Error bars indicate SD.



Supplementary Figure S2. Retinal flat mounts from dog D1 injected with AAV2/2.CMV.eGFP directly into vitreous the body. Confocal microscopy image of retinal flat mount showing foci of eGFP expression along the blood vessels (arrows). eGFP, enhanced green fluorescent protein. Scale bars: 200 μ m.

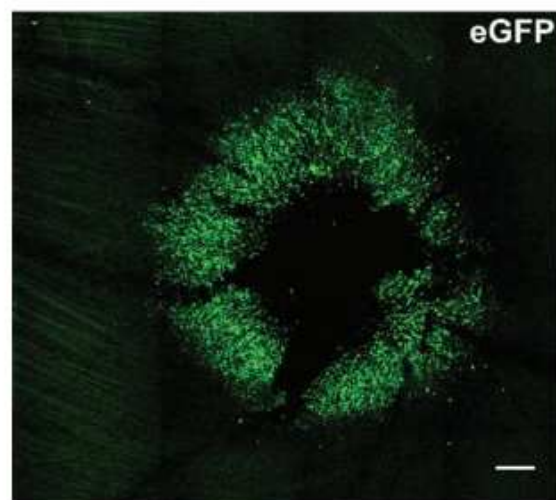


Supplementary Figure S3. Vector genome was detected in vitreous body of dogs (D1 and D2) and macaques (M1 and M2). For PCR analysis, viral DNA was extracted from the vitreous body of animals that underwent injection directly in vitreous body (Table 1) and noninjected animal as a control. PCR analysis was carried out using primers that amplified a 424 bp region within the *Gfp* DNA sequence. Reaction products were separated on an agarose gel. We set up a negative control by performing PCR reaction from the vitreous body of noninjected animal (Negative-C). As positive control, PCR analysis was performed either in viral DNA (Positive C-1) or in the vitreous body of noninjected animal in which viral DNA was spiked (Positive C-2).

lected immediately. Once collected, the sample was centrifuged and stored at -80°C . Viral DNA was extracted and purified from vitreous body using viral RNA/DNA kit (NucleoSpin Virus; Macherey-Nagel).

PCR analysis

For PCR analysis, viral DNA was extracted from the vitreous body of animals that underwent injection directly in vitreous body (Table 1) and non-injected animal as a control. The 5' primer (5' AAGTTCATCTGCACCACCG-3') and the 3' primer (5'-TGTTCTGCTGGTAGTGGTCG-3') are both located within the *Gfp* DNA sequence. The PCR-amplified vector sequence yielded a 424 bp fragment. The PCR employed GoTaq DNA polymerase (GoTaq; Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and the reaction profile was as follows: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 15 sec, 58°C for 20 sec, 72°C for 30 sec, and a final incubation step at 72°C for 10 min. Amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis.



Supplementary Figure S4. Retinal flat mounts from macaque M3 injected with AAV2/2.CMV.eGFP vector after vitrectomy. Confocal microscopy image showing an annulus of transduction around the fovea. Scale bars: 200 μ m.

II. Résultats des expériences de la partie optogénétique

A. Mise en place des conditions permettant une évaluation du transfert d'optogènes chez le chien.

1. Séquençage et sous-clonage des séquences optogénétiques dans des plasmides vecteurs AAV.

Les expériences ont débuté par le sous-clonage des transgènes optogénétiques dans des cassettes d'expression AAV, permettant ensuite leur encapsidation dans des vecteurs viraux AAV. Les séquences nucléotidiques des optogènes halorhodopsine et channelrhodopsine-2 (H134R) ont été directement commandées auprès d'un fournisseur privé (GeneArt), selon les séquences déjà décrites pour avoir permis une restauration de fonctions visuelles chez des modèles rongeurs de DRH (Tomita et al. 2007, Busskamp et al. 2010). La séquence nucléotidique de l'optogène *Opn4* humain a été produite sur mesure selon la séquence de référence Ensembl (NP_ NSCAFT00000025328) décrite sur la base de données NCBI. Le gène *Opn4* humain code pour deux variants, distincts de 33 paires de base. N'ayant aucune information pouvant justifier d'utiliser préférentiellement l'un ou l'autre des deux transcrits, nous avons arbitrairement choisi d'utiliser le transcrit présentant la version la plus longue. Enfin la dernière séquence optogénétique que nous avons souhaité sous-cloner dans une cassette d'expression AAV, codait pour la mélanopsine canine et était référencée en tant que séquence prédite par les bases de données Pubmed et Ensembl. De plus, les séquences putatives proposées par ces deux plateformes différaient pour l'exon 10 (Fig. 18 A). De ce fait, nous avons décidé de séquencer la séquence codante du transcrit *Opn4c*, à partir d'extraits rétinien de nos chiens briards sains.

Des couples d'amorces ont été produits selon les séquences proposées par chacune des deux bases de données (Fig. 18 A). L'amorce sens est commune aux deux prédictions (amorce 'F'), l'amorce anti-sens est spécifique des séquences putatives (amorce 'D' pour NCBI et amorce 'Z' pour Ensembl). Cependant cette première stratégie n'a pas conduit à l'amplification d'amplicon complet, bien que l'amplification de régions comprises dans les neuf premiers exons (ex: couple F-R de la Fig. 18A) ait été possible (données non montrées). La raison de cet échec était probablement liée d'une part au très fort pourcentage CG (>60%) des exons 10 et de la région non transcrite (UTR 3') proposé par les bases de données. De plus, la présence au niveau des exons 10 de motifs nucléotidiques très communs à d'autres transcrits canins, a aussi contribué à cet échec, en limitant les possibilités de

dessiner des amorces spécifiques. Enfin, il était possible qu'aucune des deux bases de données ne propose la véritable séquence nucléotidique de l'exon 10.

Nous avons donc décidé d'utiliser un kit RACE RLM-PCR (réf) permettant d'amplifier une séquence nucléotidique sans en connaître les extrémités. Ce kit consiste en la fixation d'adaptateurs nucléotidiques de séquences connues sur l'ensemble des ARNs rétrotranscrits d'un extrait. Des amorces spécifiques des deux adaptateurs 5' et 3' sont fournies dans le kit. Nous avons donc couplé l'amorce anti-sens de l'adaptateur 3' avec l'amorce sens 'F' spécifique de la séquence Opn4 canine. Les produits PCR issus de ce couple ont conduit à l'amplification de nombreuses bandes de tailles variées (la spécificité d'une telle PCR est limitée puisque seule l'une des deux amorces est spécifique de la séquence recherchée). Il a été décidé de réaliser une seconde PCR sur ce produit d'amplification (PCR nichée). Cette seconde PCR a été réalisée en utilisant les couples 'F-D' et 'F-Z' spécifiques des bases de données, ainsi que le couple contrôle 'F-R'. Les résultats de cette expérience (Fig. 18 B) ont conduit à l'amplification d'une bande de taille attendue pour le couple 'F-D'. Un amplicon de bonne taille est aussi présent pour la condition contrôle 'F-R'. Aucune bande n'a pu être amplifiée avec le couple 'F-Z'. L'amplicon issu des amorces 'F-D' a été séquencé, et a permis de conclure que la séquence nucléotidique prédite par la base de données Ensembl est correcte. D'autres couples spécifiques de la séquence proposée par NCBI ont été testés en PCR nichée, sans jamais conduire à une amplification détectable (données non montrées).

Ainsi, chacune des quatre séquences optogénétiques a pu être sous-clonée dans une cassette d'expression AAV, entre un promoteur et une séquence de polyadénylation, l'ensemble étant flanqué par deux séquences ITR (séquences terminales inversées) permettant l'encapsidation en vecteur AAV (Fig. 19). Pour les expériences *in vitro*, les constructions plasmidiques ont été réalisées en duplicata avec, soit le promoteur fort ubiquitaire CMV (cytomégalovirus), soit le promoteur neuronal hSyn (human synapsin-1). Les constructions avec le promoteur CMV ayant uniquement servi de contrôle durant les expériences *in vitro*, au cas où l'utilisation d'un promoteur spécifique tel que hSyn n'aurait pas permis une expression suffisante du transgène lors d'expériences impliquant des cellules non neuronales.

Toutes ces constructions plasmidiques ont été validées par séquençage, avant d'être testées *in vitro*.

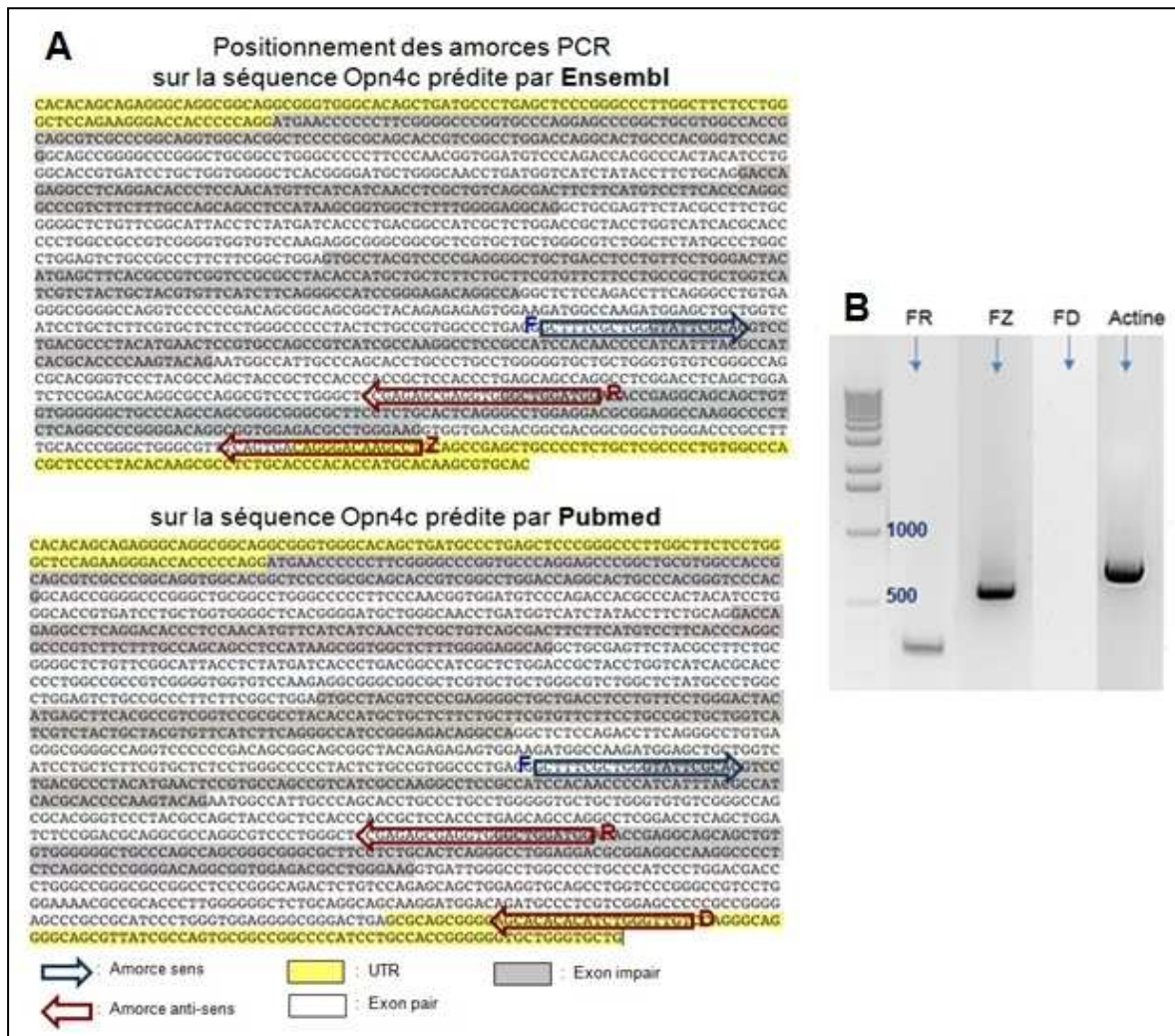


Figure 18: Identification de la séquence codante du transcrit Opn4 canin.

(A) Séquence codante du transcrit Opn4 canin prédite par les bases de données Ensembl et Pubmed proposant des séquences différentes pour l'exon 10 et la séquence UTR3'.

(B) Electrophorèse des produits de RACE RT-PCR nichées sur des extraits de neurorétines d'un chien briard sain. La première des deux PCR s'effectue entre l'amorce sens 'F' et une amorce antisens non spécifique, complémentaire d'un adaptateur lié à l'extrémité 3' de l'ensemble des transcrits extraits (kit RACE RML). Chacun des résultats de PCR présentés ici a fait l'objet d'une validation de l'intégralité du protocole d'extraction + RT-PCR par l'amplification d'un gène de ménage (actine).

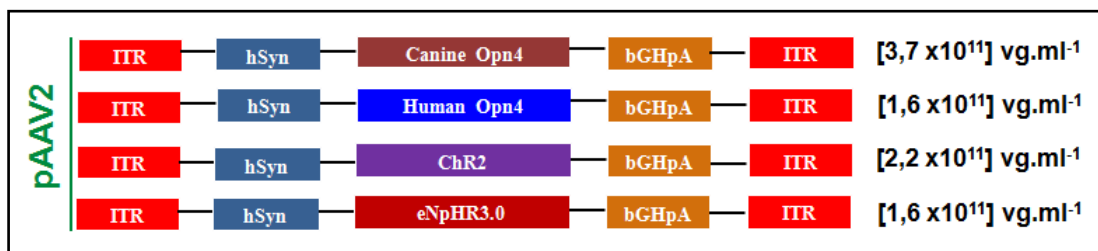


Figure 19: Résumé des cassettes d'expression contenant les transgènes optogénétiques, ainsi que les concentrations des vecteurs rAAV2/2 associés.

ITR : séquence terminale répétée inversée ; hSyn : promoteur humain du gène synapsin-1 ; Opn4 : Opsine-4 ; ChR2 : Channelrhodopsine-2 H134R ; eNpHR3.0 : Halorhodopsine version 3.0 ; bGHpA : séquence de polyadénylation dérivée de l'hormone de croissance bovine ; vg ; génome de vecteur.

2. Evaluation *in vitro* de la fonctionnalité des plasmides vecteurs contenant les optogènes.

Les plasmides vecteurs AAV contenant les cassettes d'expression optogénétiques ont été transfectés dans une lignée cellulaire humaine HEK (Human Embryonic Kidney). Pour les constructions avec les optogènes Opn4c et eNpHR, la fonctionnalité des plasmides a été validée par RT-PCR via l'amplification des transcrits Opn4c et eNpHR à partir d'extraits de cellules HEK transfectées (Fig. 20 A et B). Pour détecter l'expression de l'optogène Opn4h, plusieurs anticorps sont disponibles pour une utilisation en western blot (WB) ou en immunofluorescence (IF). Cependant, malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons obtenu aucun résultat probant avec ces anticorps, faute d'une spécificité suffisante (données non montrées). Nous avons donc décidé de faire produire à façon un anticorps dirigé contre les 19 premiers acides aminés de la séquence Opn4 humaine (Protéogénix France, MC-19). Nous disposons également d'un anticorps dirigé contre l'optogène Chr2 (Progen, réf 651180) décrit comme étant spécifique pour une utilisation par marquage immunofluorescent (IF) (Kleinlogel et al. 2011). Ainsi, disposant d'anticorps spécifiquement dirigés contre les optogènes Opn4h et Chr2, la fonctionnalité de leurs plasmides vecteurs a été validée par immunocytochimie sur cellules HEK transfectées (Fig. 21).

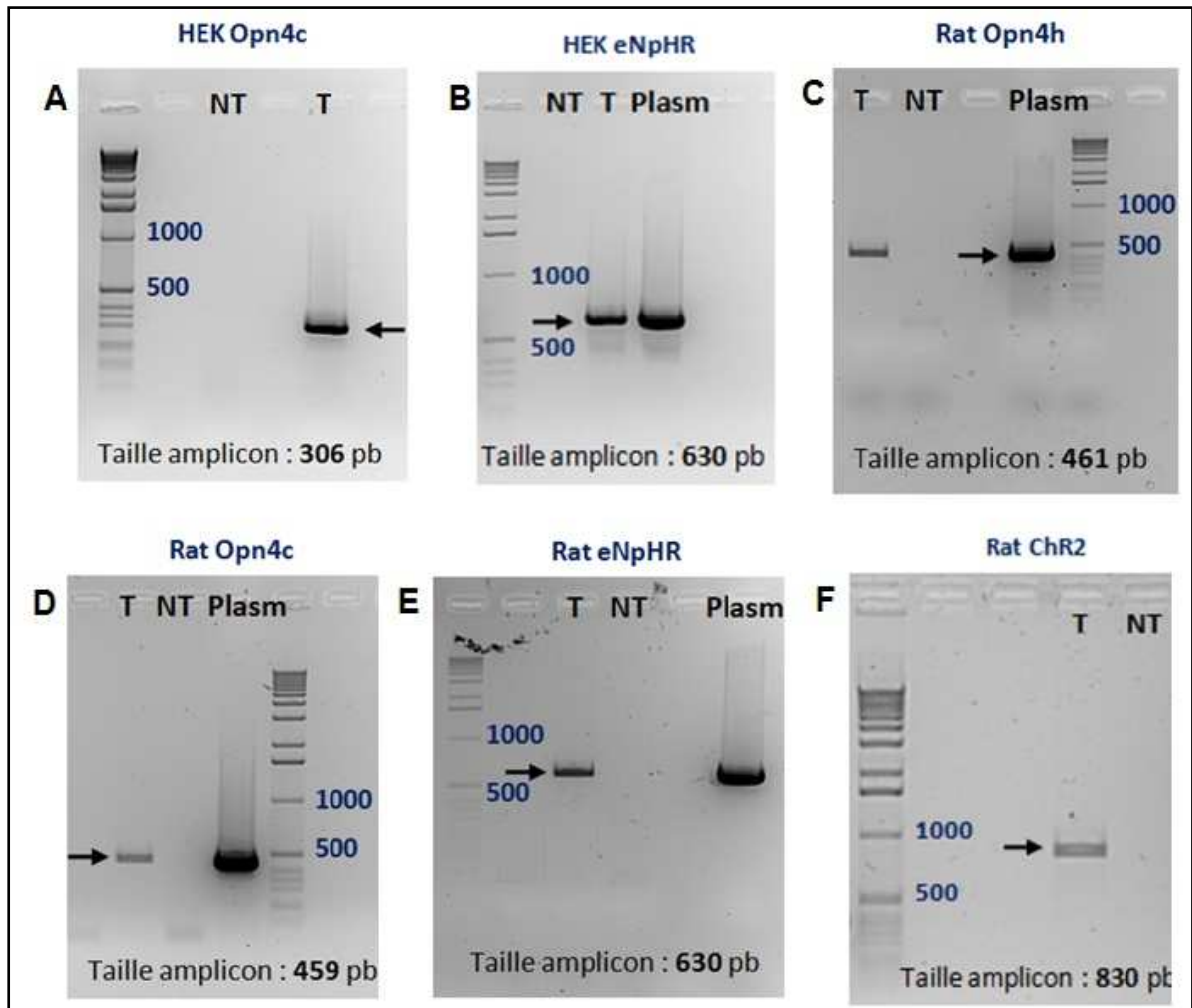


Figure 20: Validation de la transcription des transgènes optogénétiques par RT-PCR après transfert d'optogènes.

(A-B) Electrophorèse des produits de RT-PCR sur des extraits de cellules HEK293 transfectées avec les cassettes d'expression AAV contenant les transgènes Opn4 canin ou halorhodopsine, sous contrôle d'un promoteur hSyn (human synapsin-1). (C-F) Electrophorèse des produits de RT-PCR extraits à partir des neurorétines de rats sains injectés avec l'ensemble des vecteurs recombinants codant pour des optogènes. Les extractions d'ARN sont réalisées sur des rétines prélevées 6 mois post-injection. HEK: human embryonic kidney ; NT : œil non traité ; T : œil traité ; Plasm : contrôle positif avec plasmide contenant la cassette d'expression.

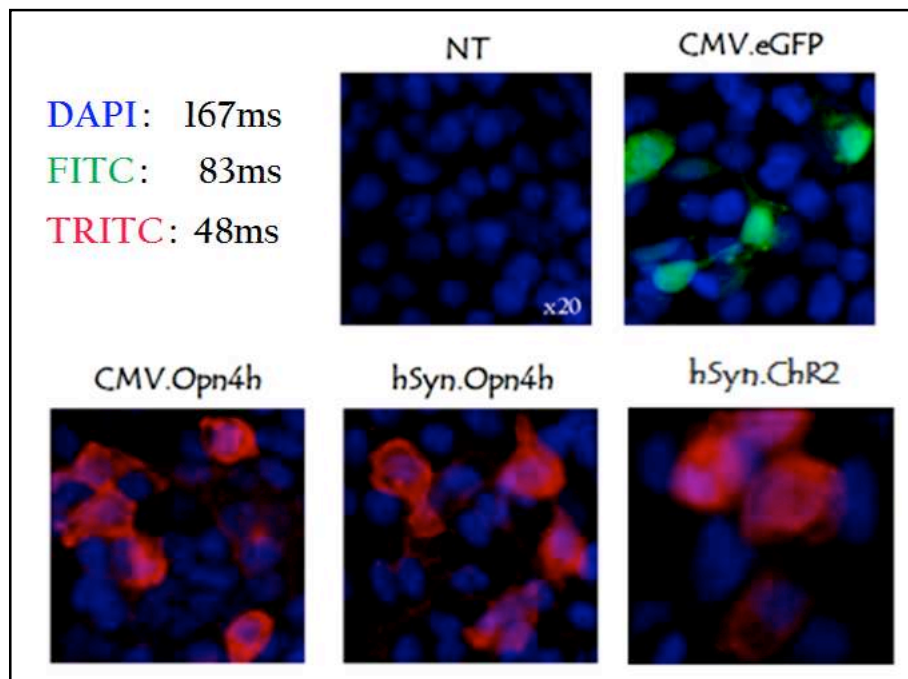


Figure 21: Validation de l'expression des optogènes Chr2 et Opn4h après transfection de cellules humaines HEK293.

Transfection au phosphate de calcium des cellules HEK293 par des plasmides contenant les mêmes cassettes d'expression que celles utilisées par la suite pour l'encapsidation des rAAV2/2. La condition NT représente le contrôle négatif de transfection (sans plasmide) ayant été marqué avec un anticorps produit chez le lapin anti-Opn4h (MC-19) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa546 (filtre TRITC). Le contrôle positif de transfection contenant une cassette d'expression CMV.eGFP n'a pas été marqué avec des anticorps, la fluorescence observée est donc naturelle. Les conditions CMV.Opn4h et hSyn.Opn4h ont été marquées avec le même couple d'anticorps que le contrôle négatif. Enfin, la condition hSyn.ChR2 a été marquée avec un anticorps primaire anti-ChR2 (Progen, réf 651180) puis avec un anticorps secondaire couplé, Alexa546. Les temps d'exposition indiqués en légende sont les mêmes pour toutes les images.

3. Evaluation *in vitro* de la fonctionnalité des optogènes Opn4 humains et canins.

Il a déjà été démontré que l'expression de l'optogène opn4 humain (la référence de la séquence précise n'est pas communiquée) dans des cellules HEK conduit à des variations de la concentration calcique intracellulaire suite à des stimulations lumineuses bleues (Kumbalasiri et al. 2007, Giesbers et al. 2008). Ces variations de concentration calcique peuvent être analysées grâce à l'utilisation de sondes calciques fluorescentes, telle que la sonde Fura-2AM, dont le fonctionnement est détaillé dans la figure 22. Nous avons décidé de reproduire ces expériences après transfections de cellules HEK avec nos cassettes d'expression contenant soit l'optogène Opn4 humain, soit l'optogène Opn4 canin. Suite à une stimulation bleue (480nm), les cellules HEK exprimant l'optogène Opn4 humain (Fig. 23 A) ou canin (Fig. 23 B) présentent une forte augmentation de leur concentration calcique alors que pour la condition contrôle exprimant l'enzyme Rpe65, aucune variation n'est détectée (Fig. 23 C). Cette expérience a été répétée plusieurs fois sur différentes cellules HEK, sans jamais détecter d'activation corrélée aux flashes dans les cellules contrôles non transduites avec un optogène. Cette même expérience a été menée sans succès pour tester la fonctionnalité de l'optogène ChR2 (résultats non montrés). De fait, l'optogène ChR2 est un canal cationique non spécifique pouvant aussi bien laisser passer les ions calciques que les ions sodiques ou potassiques. Cette non spécificité explique peut-être les résultats non reproductibles observés avec la channelrhodopsine-2. L'halorhodopsine étant déjà décrite comme étant une pompe à chlorure, nous n'avons pu évaluer cet optogène par test de fonctionnalité calcique (et nous ne disposons pas de sonde chlorique).

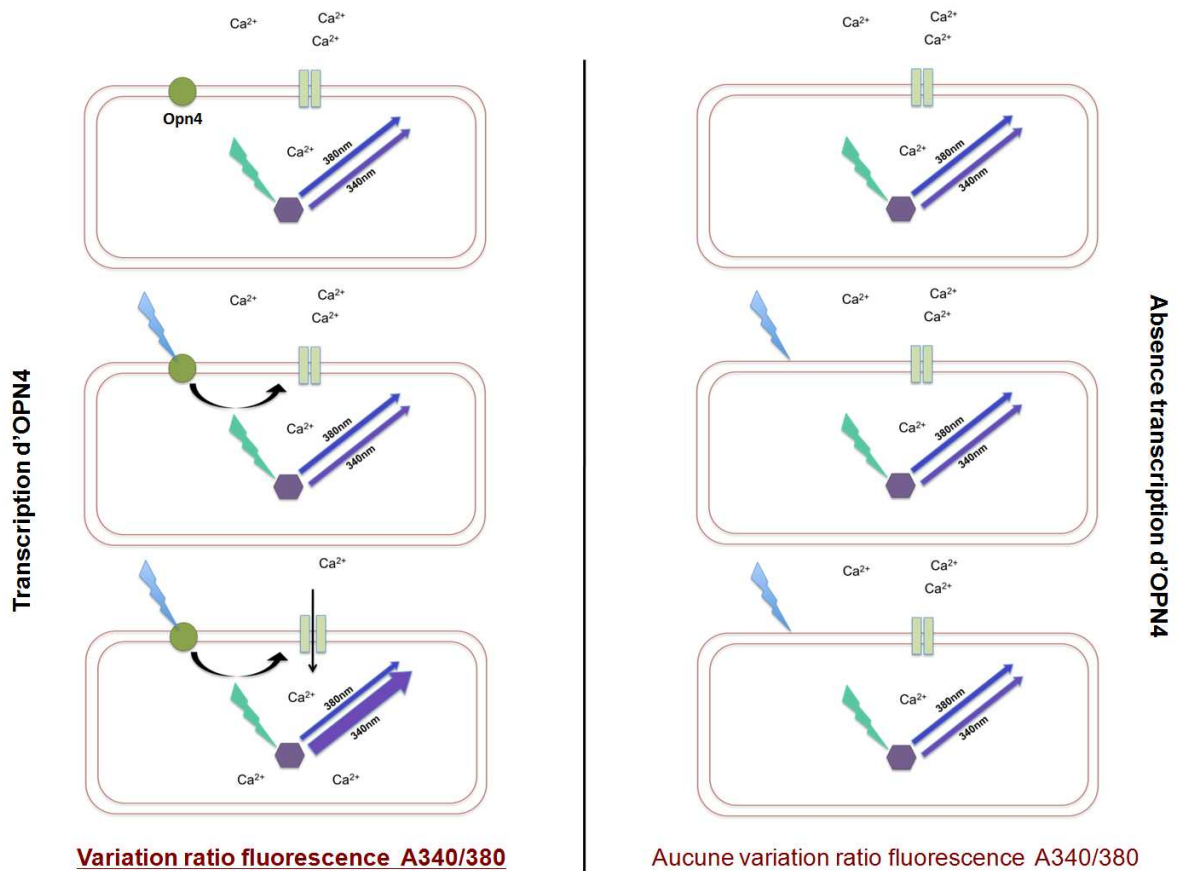


Figure 22: Principe du fonctionnement de la sonde calcique Fura-2AM en présence ou non d'un optogène opn4 fonctionnel

La sonde Fura-2AM, au préalable chargée dans la cellule, est sensible à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette sonde émet constamment deux longueurs d'onde, l'une à 340nm et l'autre à 380nm, en réponse à une stimulation lumineuse verte à 505nm. Le ratio de ces deux intensités émises est une constante pour une concentration de calcium donnée. Il est établi au début de l'expérience, à l'état initial, et est propre à chaque cellule. En présence d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration calcique intracellulaire, l'intensité de fluorescence émise à 380 nm va respectivement augmenter ou diminuer, impactant directement le ratio de fluorescence. Ainsi, si l'optogène opn4 est exprimé et est fonctionnel, l'envoi d'une stimulation dans son spectre d'excitation ($\lambda = 470\text{nm}$) se traduit par une augmentation du ratio de fluorescence de la sonde. Si l'optogène n'est pas exprimé ou s'il n'est pas fonctionnel, alors l'envoi de lumière bleue n'aura aucune conséquence sur le ratio de fluorescence de la sonde, traduisant une absence de variation de la concentration calcique intracellulaire.

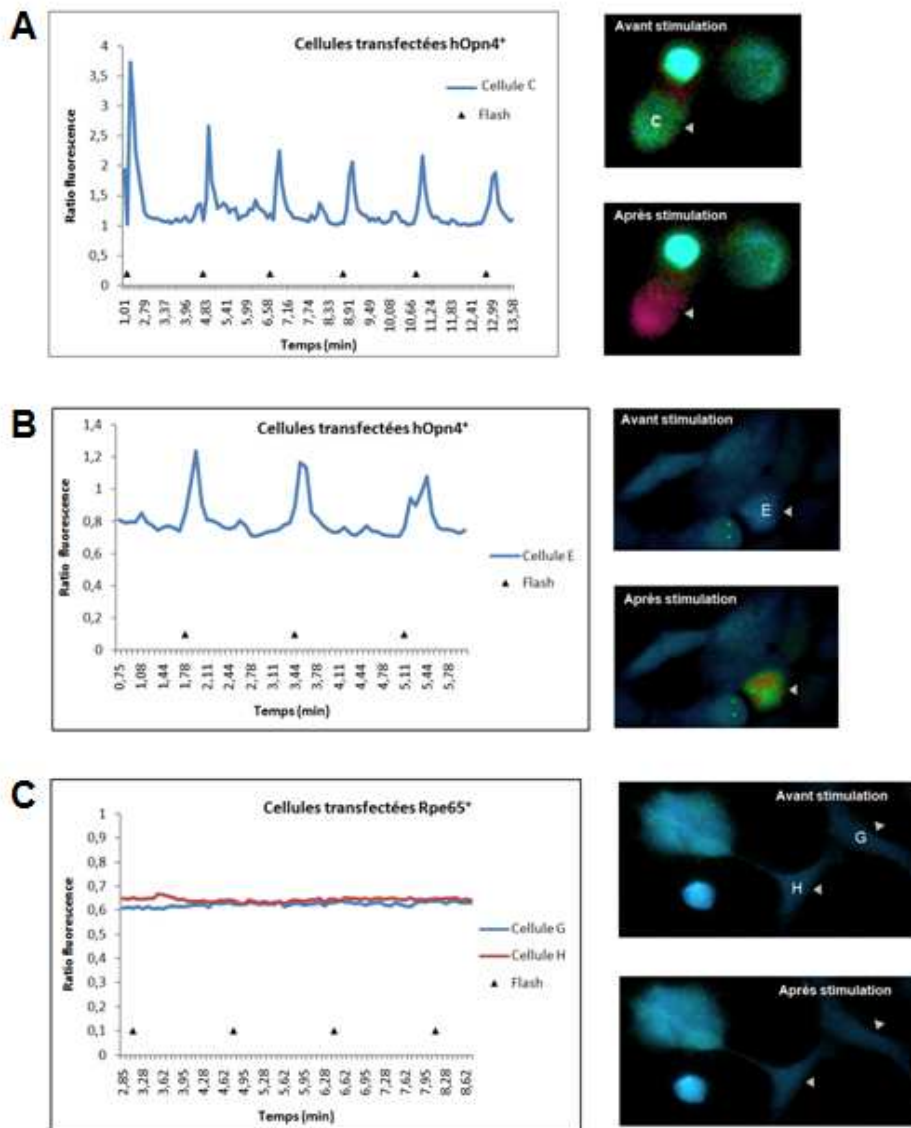


Figure 23: Evaluation de la fonctionnalité des optogènes Opn4h et Opn4c à l'aide d'une sonde calcique fluorescente.

Suite à la transfection de cellules HEK par une cassette d'expression contenant un transgène (A) Opn4 humain, (B) Opn4 canin ou (C) Rpe65 humain, les cellules sont stimulées par une lumière bleue $\lambda = 470\text{nm}$ (\blacktriangle triangle noir) pendant 5 secondes. La variation en concentration calcique peut être observée par la variation du ratio de fluorescence de la sonde calcique Fura-2AM. Une représentation couleur permet de visualiser ces variations de concentration calcique selon un dégradé de couleurs chaud (forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$) - froid (faible $[\text{Ca}^{2+}]_i$).

4. Production des vecteurs viraux à partir des plasmides vecteurs contenant les cassettes d'expression codant pour les quatre optogènes sous promoteur spécifique hSyn.

Suite à la validation de la fonctionnalité des plasmides vecteurs AAV, par RT-PCR ou IF, l'ensemble des cassettes d'expression a été encapsidé dans des vecteurs viraux AAV de sérotype 2. Les titres de ces différentes productions sont détaillés dans la figure 19. Seules les constructions optogénétiques contenant le promoteur hSyn ont été utilisées *in vivo*. Le choix d'utiliser le promoteur hSyn est lié à sa spécificité pour les cellules neuronales, ce qui n'est pas le cas du promoteur ubiquitaire CMV. Nous n'aurions cependant pas fait ce choix si nous n'avions pas constaté que le promoteur hSyn induisait une expression au moins aussi importante que le promoteur fort CMV : comme le témoigne l'expression de l'eGFP dans les cellules ganglionnaires de rat après injection intravitreuse, par analyse funduscopique (Fig. 24 A et B) ou par analyse en microscopie confocale (Fig 24 C et D). À noter que les deux productions étaient à des titres équivalents puisque le vecteur rAAV2.CMV.eGFP était à une concentration de 5×10^{11} vg/ml alors que le vecteur rAAV2.hSyn.eGFP était à un titre de 7×10^{11} vg/ml. Enfin, les images en fond d'œil présentées en figure 24 sont celles au moment du pic d'expression maximum. Or on remarque que le pic est atteint en seulement 10 jours avec le promoteur hSyn, contre 30 jours avec la construction CMV.

Pour ces raisons, et ne souhaitant pas augmenter davantage le nombre de vecteurs utilisés dans l'étude (au risque de limiter un peu plus le nombre d'individus par groupe), nous avons donc choisi d'injecter les animaux uniquement avec les vecteurs contenant les constructions sous promoteur hSyn.

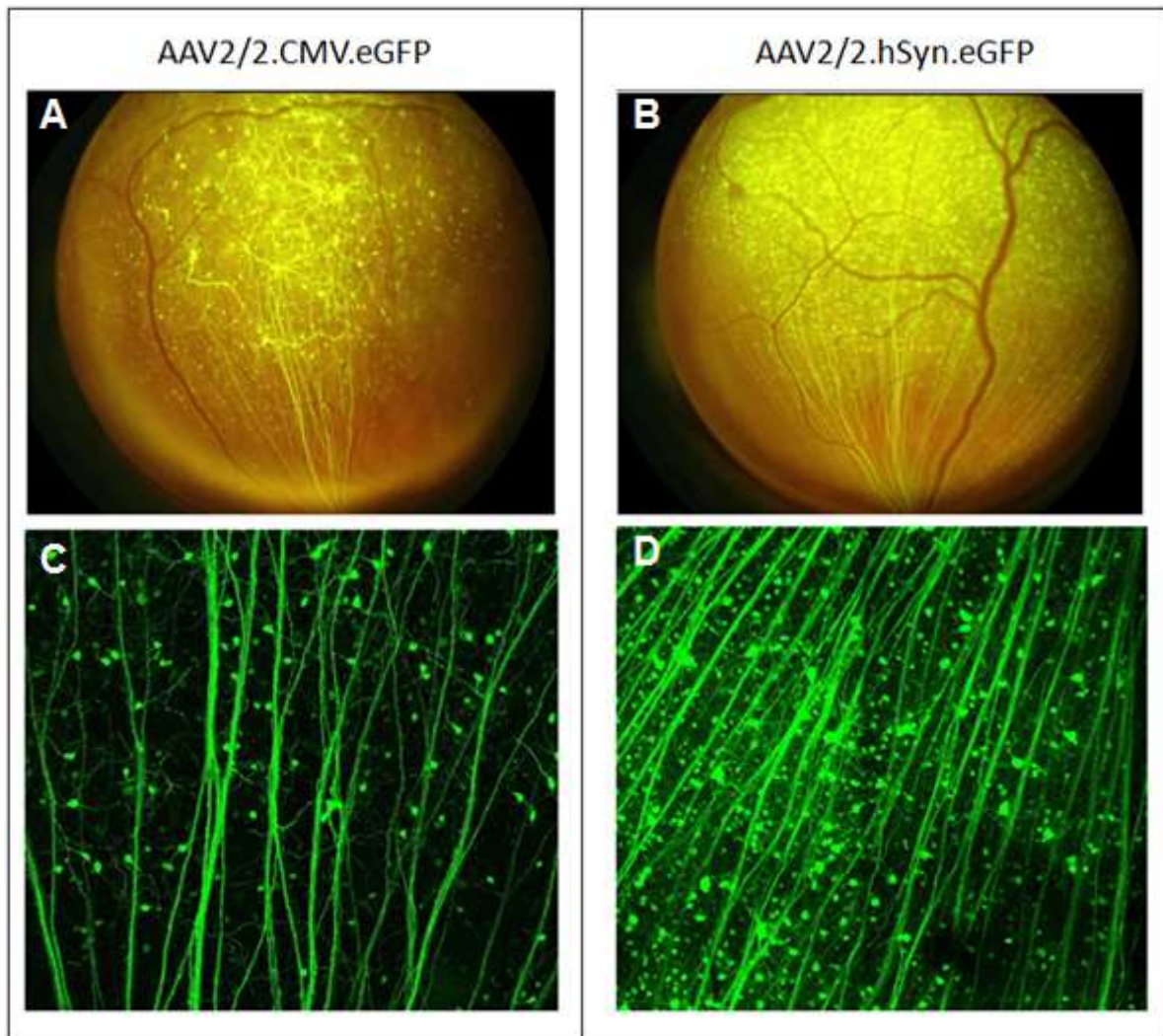


Figure 24: Profil de transduction de l'eGFP suite à l'injection de vecteurs rAAV2/2 par voie intravitréenne chez des rats sains.

(A-B) Observation en fond d'oeil de l'expression de l'eGFP en rétine supérieure, une fois le pic d'expression atteint, soit (A) 4 semaines post-injection pour une cassette d'expression sous promoteur CMV (B) soit 10 jours post-injection pour une cassette d'expression sous promoteur hSyn. (C-D) Observation en microscopie confocale de l'expression de l'eGFP dans la couche des cellules ganglionnaires rétiniennes (x60). rAAV2.CMV.eGFP : 5×10^{11} vg/ml ; rAAV2.hSyn.eGFP : 7×10^{11} vg/ml ; 5 μ l injecté. Expérience réalisée en duplicata.

5. Evaluation de l'expression des produits de transgènes et de leur tolérance chez des rats sains.

Les rats sains ont été injectés par voie intravitreuse avec 5 μ l de l'un des vecteurs, sur un œil, l'autre servant d'œil controlatéral. Quatre rats ont ainsi été administrés pour chaque vecteur. Chaque rat a été analysé par fond d'œil et électrorétinogramme avant injection, puis à 1, 2 et 3 mois post-injection. Aucune altération des fonctions ERG n'a été remarquée. Aucun signe de toxicité (dilatation des vaisseaux sanguins, autofluorescence) n'a été observé en fond d'œil sur l'œil injecté (données non montrées).

Suite au sacrifice des rats injectés, 4 à 6 mois post-injection, les rétines ont été prélevées et analysées par RT-PCR pour valider la fonctionnalité des vecteurs recombinants *in vivo*. Ainsi, nous avons pu valider pour chaque optogène la présence de transcrite dans les rétines des rats injectés correspondants (Fig. 20 C-F). Les expériences ont été réalisées en présence d'un contrôle positif (amplification du plasmide vecteur correspondant) et d'un contrôle négatif (œil controlatéral non injecté).

Pour le cas des optogènes Opn4h et ChR2, puisque nous disposions d'anticorps spécifiques, nous avons pu valider la traduction des transcrits codant pour ces deux optogènes par microscopie confocale après marquage immunohistochimique sur rétines montées à plat (Fig.25). La rétine marquée avec l'anticorps anti-Opn4h présentait un assez fort marquage aspécifique lié à l'anticorps primaire, même si des zones de marquage spécifique (incluant soma et axone de cellules ganglionnaires) ont pu être observées (Fig. 25 E). Le marquage réalisé à l'aide de l'anticorps anti-ChR2 a été de bien meilleure qualité, on a ainsi pu observer une forte transduction des axones des cellules ganglionnaires de rat, convergeant au niveau de la tête du nerf optique (Fig. 25 A). La majorité des somas des cellules ganglionnaires transduites se trouvant en rétine périphérique (Fig. 25 B), résultat cohérent avec les observations faites dans notre publication avec un transgène rapporteur eGFP (Tshilenge et al. 2016). À un grossissement plus fort (x60), on observe aussi une importante concentration de cellules ganglionnaires exprimant l'optogène ChR2 dans les zones de transduction (Fig. 25 C et D).

L'ensemble de ces résultats, démontrant la fonctionnalité et la tolérance de l'ensemble des vecteurs chez des rats sains, nous a permis de poursuivre l'étude par l'injection de modèles canins sains.

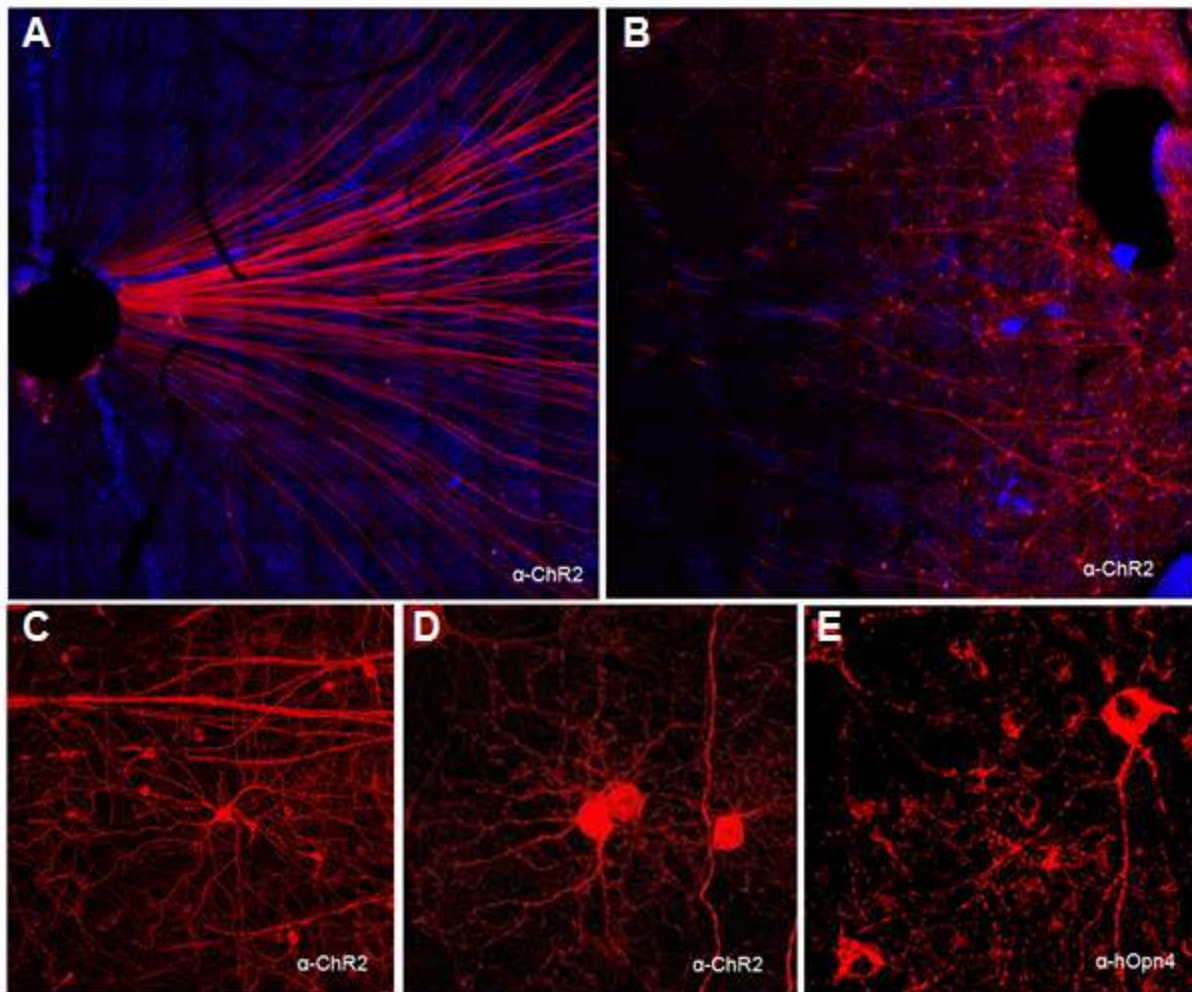


Figure 25: Profil de transduction après injection intravitréenne de vecteurs rAAV2/2 hSyn.Optogènes dans les cellules ganglionnaires de rats sains.

(A-D) Images confocales d'une rétine en montage à plat présentant une expression étendue de l'optogène channelrhodopsine-2 (Progen, réf 651180), 6 mois post-injection. (A) On observe le groupement de nombreux axones de cellules ganglionnaires transduites au niveau de la papille et dont (B-D) les somas se trouvent en rétine périphérique. (E) Observation confocale de cellules ganglionnaires transduites, après marquage anti-Opn4h (MC-19), au niveau des somas et des axones d'un rat sain.

B. Evaluation du transfert d'optogènes chez le chien

Pour permettre de rapidement retrouver une information concernant les expériences de ce projet de thèse, trois tableaux résument les éléments importants de la partie résultat de ce manuscrit. Le tableau 2 répertorie l'ensemble des expériences menées dans ce projet (*in vitro* et *in vivo*), selon l'optogène évalué (à l'exception des expériences dont les contrôles n'ont pas été concluants). Le tableau 3 résume l'ensemble des injections chez les chiens sains et déficients, ainsi que tous les paramètres importants liés aux procédures chirurgicales. Enfin, le tableau 4 synthétise, pour chaque chien injecté, les résultats des expériences concernant la recherche des produits de transgène, les enregistrements ERG et MEA, ainsi que l'évaluation de la tolérance (après suivi funduscopique et tomographique).

	Chr2 - Channelrhodopsine	Opn4h - Mélanopsine humaine	Opn4c - Mélanopsine canine	eNpHR - Halorhodopsine
In vitro - HEK293	Immunofluorescence	Immunofluorescence Test de fonctionnalité : sonde calcique	Clonage du gène RT-PCR Test de fonctionnalité : sonde calcique	RT-PCR
In vivo - Rat	ERG RT-PCR IF montage à plat	ERG RT-PCR IF montage à plat	ERG RT-PCR	ERG RT-PCR
In vivo - chien sain	ERG IF montage à plat	ERG		ERG RT-PCR
In vivo - Chien Rpe65^{-/-}	ERG sd-OCT MEA IF montage à plat	ERG sd-OCT MEA RT-PCR	ERG sd-OCT RT-PCR	ERG sd-OCT RT-PCR

Tableau 2: Résumé des expériences réalisées, selon le modèle animal et l'optogène utilisé.

Tous les animaux injectés ont fait également l'objet d'un suivi funduscopique avant et après injection.

RT-PCR : Retro-Transcription - Polymerase Chain Reaction ; ERG : Electro-RetinoGramme ; IF : Immuno-Fluorescence ; sd-OCT : Tomographie par Cohérence Optique en domaine spectral ; MEA : Micro-Electrode en ligne ; HEK : Human Embryonic Kidney

Nom	Statut	Age à l'injection	Optogène	volume	CEIL Injecté	Remarque chirurgie	Temps post-injection au sacrifice
<i>Imac</i>	Sain (setter)	7 mois	Chr2	500ul	OD	-	1 an
<i>lfraise</i>	Sain (Beagle)	< 1 an	eNpHR	500ul	OD	-	7 mpi
<i>Ipomme</i>	Sain (Beagle)	< 1 an	Opn4h	500ul	OD	-	14 mpi
Extreme	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	4,5 ans	Opn4h	500ul	OD	-	10 mpi
Guess	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	3 ans	Opn4h	500ul	OD	-	21 mpi
Eroïne	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	5 ans	Chr2	500ul	OG	Cristallin OD embroché	20 mpi
Fripon	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	4 ans	eNpHR	500ul	OD	-	18 mpi
Jumbe	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	7 mois	Opn4h	2ml	OD	Hémorragie rétinienne (faible)	17 mpi
Jobi	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	8 mois	Opn4h	2ml	OD	Hémorragie rétinienne (faible)	20 mpi
Jazzy	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	10 mois	Opn4 canin	1ml	OD	-	15 mpi
Jerk	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	13 mois	Chr2	1ml	OG	Cristallin OD embroché	13 mpi
Jumper	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	15 mois	eNpHR	1ml	OD	Décollement totale de rétine	4 mpi
Jolly	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	15 mois	Chr2	1ml	OD	-	9 mpi
Juvamine	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	17 mois	Chr2	1ml	OD	-	7 mpi
lowa	Sain (setter)	Contrôle PEV	Non injecté	-	-	-	-
Formica	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	Contrôle PEV	pRp65, Rp65h		OD	-	> 3 ans post-injection
Gugus	Rpe65 ^{+/+} (Briard)	test comportement	pRp65, Rp65h		OD	-	> 3 ans post-injection

Tableau 3: Détails des procédures chirurgicales de l'ensemble des chiens impliqués dans le projet de transfert d'optogènes.

mpi : mois post-injection ; PEV : Potentiel Evoqué Visuel.

Nom	Optogène	Statut	Présence produit transgène	Restauration ERG	Photosensibilité MEA	Tolérance du transgène
Imac	ChR2	sain	Validée (IF)			Validée
Eroïne	ChR2	Rpe65 ^{-/-}	Validée (IF)	Négative	Non-testée	Validée
Jerk	ChR2	Rpe65 ^{-/-}	Négative (IF)	Négative	Négative	Validée
Jolly	ChR2	Rpe65 ^{-/-}	Validée (IF)	Négative	Non-testée	Validée
Juvamine	ChR2	Rpe65 ^{-/-}	Négative (IF)	Négative	Négative	Validée
Ipomme	Opn4 humain	sain	Négative (IF)			Validée
Extreme	Opn4 humain	Rpe65 ^{-/-}	Validée (RT-PCR)	Validée (1 et 2 mpi)	Non-testée	Validée
Guess	Opn4 humain	Rpe65 ^{-/-}	Négative (RT-PCR)	Validée (1 et 2 mpi)	Négative	Validée
Jumbe	Opn4 humain	Rpe65 ^{-/-}	Non-testée	Négative	Non-testée	Validée
Jobi	Opn4 humain	Rpe65 ^{-/-}	Validée (RT-PCR)	Négative	Validée	Validée
Ifraise	eNpHR	sain	Validée (RT-PCR)			Validée
Fripon	eNpHR	Rpe65 ^{-/-}	Négative (RT-PCR)	Négative	Non-testée	Validée
Jumper	eNpHR	Rpe65 ^{-/-}	Non-testée	Non-testée	Non-testée	Non-testée
Jazzy	Opn4 canin	Rpe65 ^{-/-}		Négative	Non-testée	Validée

Tableau 4: Synthèse des résultats obtenus lors de l'évaluation de la présence des produits du transgène, des enregistrements ERG et MEA ainsi que lors de l'évaluation de la tolérance par suivis funduscopiques et tomographiques, pour l'ensemble des chiens injectés.

Case barrée : test impossible ; mpi : mois post-injection ; MEA : micro électrodes en ligne ; ERG : Electrorétinographie.

1. Evaluation de l'expression des produits du transgène et de leur tolérance chez des chiens sains.

Le vecteur codant pour le transgène Opn4 canin n'a pas été testé dans cette partie du projet, consistant principalement à évaluer la tolérance des optogènes chez le chien, puisque la séquence Opn4c est une séquence endogène.

Ainsi chaque vecteur codant soit pour l'optogène eNpHR, ChR2 ou Opn4h a été administré dans l'œil d'un chien sain, l'autre servant d'œil controlatéral. Chacun de ces trois chiens a été analysé par funduscopie et électrorétinographie avant injection, puis à 10 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois et 6 mois post-injection (mpi). Aucune altération des fonctions ERG n'a été remarquée et aucun signe de toxicité (dilatation des vaisseaux sanguins, autofluorescence) n'a été observé en fond d'œil sur les yeux injectés (données non montrées).

L'analyse s'est poursuivie chez ces trois chiens par la recherche de l'expression des produits des transgènes. De ce fait, les rétines du chien iFraise ont été prélevées et analysées par RT-PCR pour vérifier la transcription du transgène eNpHR. Ainsi nous avons pu confirmer la présence de transcrits de l'halorhodopsine chez ce chien sain à 7mpi (Fig. 31 F).

L'évaluation de l'expression des optogènes ChR2 et Opn4h s'est faite par IF, respectivement, sur les rétines montées à plat des chiens iMac et iPomme. Pour l'expérience avec le chien iPomme, aucun marquage spécifique n'a pu être dissocié de l'important bruit de fond lié au marquage non spécifique de l'anticorps primaire anti-Opn4h dans les rétines canines. Lors de l'évaluation du chien iMac, nous avons pu observer l'expression de l'optogène ChR2 dans de nombreuses cellules ganglionnaires canines (Fig. 26).

L'absence de toxicité observée chez ces trois chiens sains, bien que l'expression d'opn4h n'a pu être confirmée, nous a permis d'être plus confiants quant à la bonne tolérance de l'expression de transgènes ectopiques, dérivés d'algue (eNpHR) ou de bactérie (ChR2), chez le chien. L'étude s'est donc logiquement poursuivie par l'injection des modèles canins déficients pour le gène Rpe65^{-/-}.

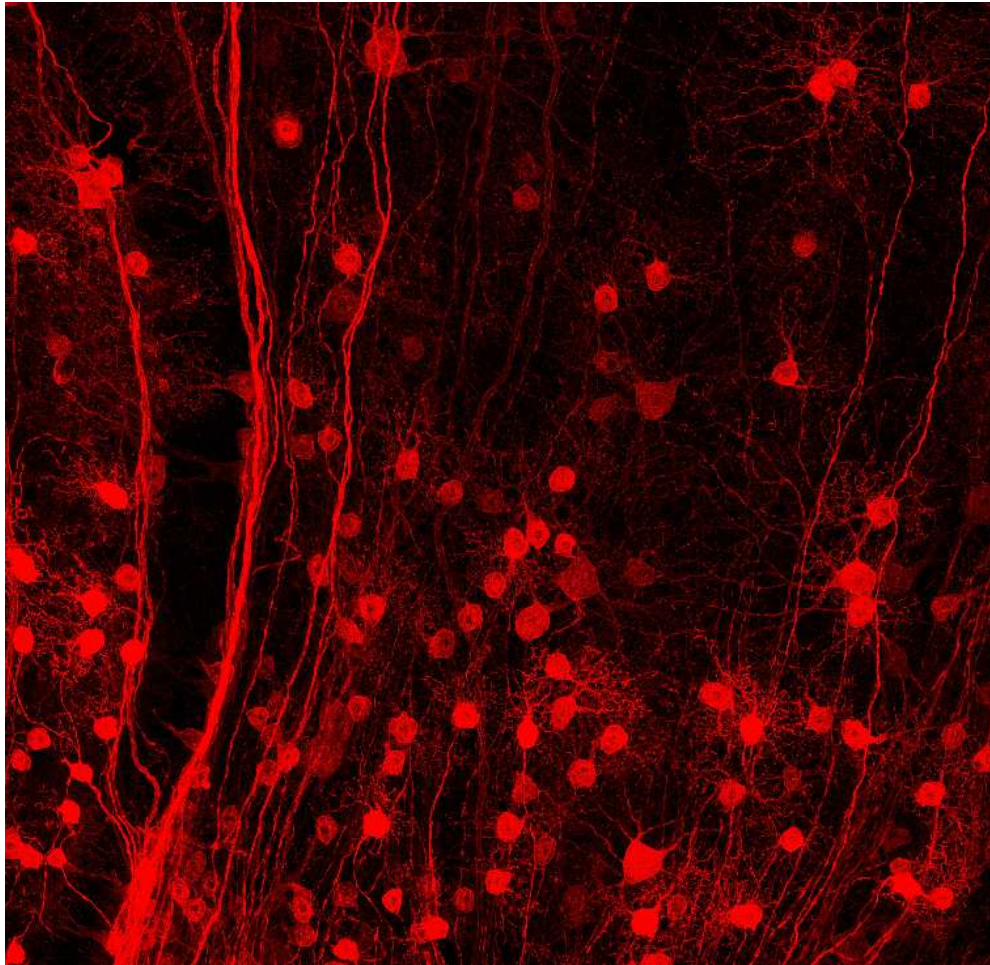


Figure 26: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans les cellules ganglionnaires du chien sain iMac.

Image confocale d'une rétine en montage à plat présentant une expression étendue de l'optogène channelrhodopsine-2 (ChR2) dans la partie temporale supérieure de la rétine d'un chien sain (iMac) injecté à l'âge de 7 mois et sacrifié 12 mois post-injection. La procédure chirurgicale est composée d'une vitrectomie, avant l'injection par voie intravitréenne du vecteur recombinant (500 μ l, 2×10^{11} vg.ml⁻¹). 500 μ m, x30.

2. Evaluation de la restauration des fonctions électrorétinographiques (ERG) suite au transfert d'optogènes chez le modèle canin Rpe65^{-/-}.

Tous les chiens déficients ont été injectés uniquement après la disparition de l'ensemble des fonctions ERG (ERG plein champ) détectables selon le protocole standard. Suite à l'injection, l'ensemble des rétines canines a été évalué à 1, 2, 3 et 5 mois post-injection (mpi) et certaines à plus de 9 mpi. Les résultats ERG sont rassemblés dans le tableau 5.

Deux chiens, Extreme et Guess, injectés avec le vecteur thérapeutique codant pour l'optogène Opn4 humain, ont présenté une faible restauration de fonctions ERG à 1 et 2 mpi. Cette restauration transitoire est détectée dans les procédures "flicker" et "ERG scotopique mixte" ($3 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$). Les tracés bruts des réponses ERG flickers des chiens Guess (Fig. 27) et Extreme (Fig. 28), avant et après injection, permettent de constater que la restauration n'est bien présente que sur l'œil traité après injection. Bien que de faibles amplitudes ($<12 \mu\text{V}$) soient observées, on remarque distinctement les pseudo-oscillations spécifiques de cette procédure. Cette faible restauration n'a pas été détectée au-delà de 2 mpi chez ces deux chiens, et n'a pas été observée chez d'autres chiens, quels que soient les vecteurs utilisés (Tab 5).

À noter que 4 procédures supplémentaires d'ERG plein champ ont été testées, dans des conditions lumineuses adaptées aux spectres d'absorption des optogènes testés. Ainsi, deux procédures en ambiance scotopique sur fond orange ont été testées avec : soit des stimulations bleues (couvrant le spectre d'absorption des optogènes Opn4 et ChR2), soit des stimulations rouges (plus adaptées au pic d'absorption d'eNpHR). Chacun de ces deux flashes avait une intensité de $3 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. La procédure scotopique "Phnr", déjà décrite comme permettant d'évaluer la réponse des cellules ganglionnaires et utilisée pour diagnostiquer les glaucomes, a été aussi utilisée sur nos chiens traités. Enfin, en plus d'utiliser la procédure scotopique mixte bâtonnet – cône ($3 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) du protocole standard, nous avons augmenté l'intensité des flashes de cette procédure d'un log pour atteindre $30 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et permettre une stimulation lumineuse plus forte des optogènes. Malgré toutes ces optimisations, ces procédures n'ont pas permis de détecter de restauration de fonctions rétiniennes sur l'œil injecté (données non montrées). Ces procédures ont été développées quelques mois après l'injection des premiers chiens, et n'ont donc pas été testées pour les évaluations à 1, 2 et 3 mpi des chiens Extreme, Guess, Fripon et Eroïne.

Optogène	Chien	Age à l'injection	1mpi	2mpi	3mpi	5mpi	<9mpi
Opn4h	Extreme	4,5 ans	< 9 uV (ERG max) < 4 uv (Flicker)	< 11 uV (ERG max) < 7 uv (Flicker)	< L.D	< L.D	†
	Guess	3 ans	< 9 uV (ERG max) < 7 uv (Flicker)	< 9 uV (ERG max) < 12 uv (Flicker)	< L.D	< L.D	< L.D
	Jumbe	7 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
	Jobi	8 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
Opn4c	Jazzy	10 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
ChR2	Eroïne	4,5 ans	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
	Jerk	12 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
	Jolly	15 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	†
	Juvamine	15 mois	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	†
eNphR	Fripon	4 ans	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
	Jumper	18 mois	< L.D	< L.D	< L.D	†	†

Tableau 5: Suivi des fonctions rétiniennes par ERG, selon le protocole standard, de l'ensemble des chiens Rpe65^{-/-} injectés avec un vecteur transportant une cassette d'expression pour un optogène.

L.D : Limite de détection ; mpi : mois post-injection ; † : sacrifié avant analyse. ERG max : procédure scotopique mixte cône -bâtonnet avec stimulation de $3 \text{ cd.s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

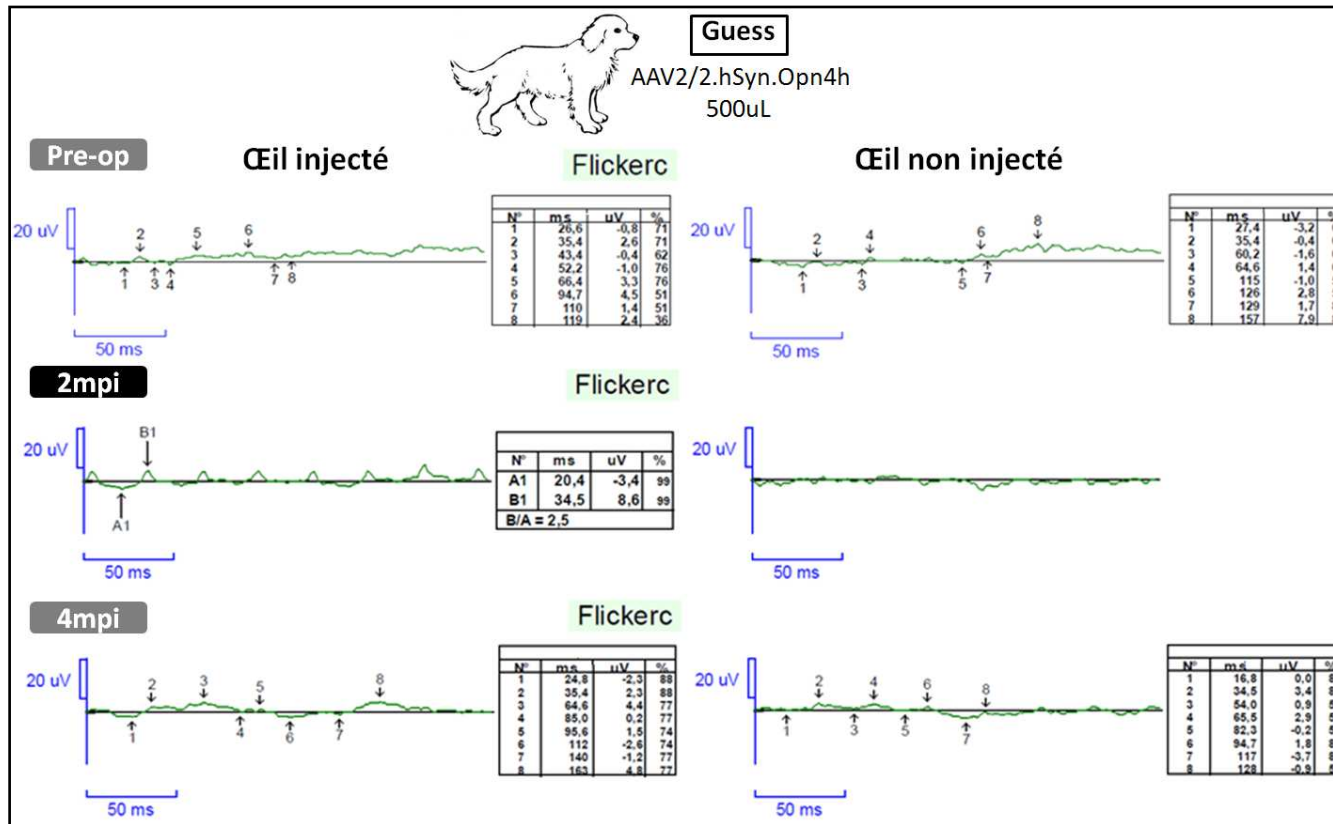


Figure 27: Evaluation des fonctions rétiniennes par électrorétinographie du chien Guess $Rpe65^{-/-}$ injecté avec le vecteur rAAV2/2.hSyn.Opn4h

Tracés bruts de la réponse électrique rétinienne en condition flicker 30Hz, avant injection (Pre-op) puis à 2 mois (2mpi) et 4 mois post-injection (4mpi). Chien $Rpe65^{-/-}$ Guess, injecté à l'âge de 3 ans, [1.6×10^{11}] vg/ml.

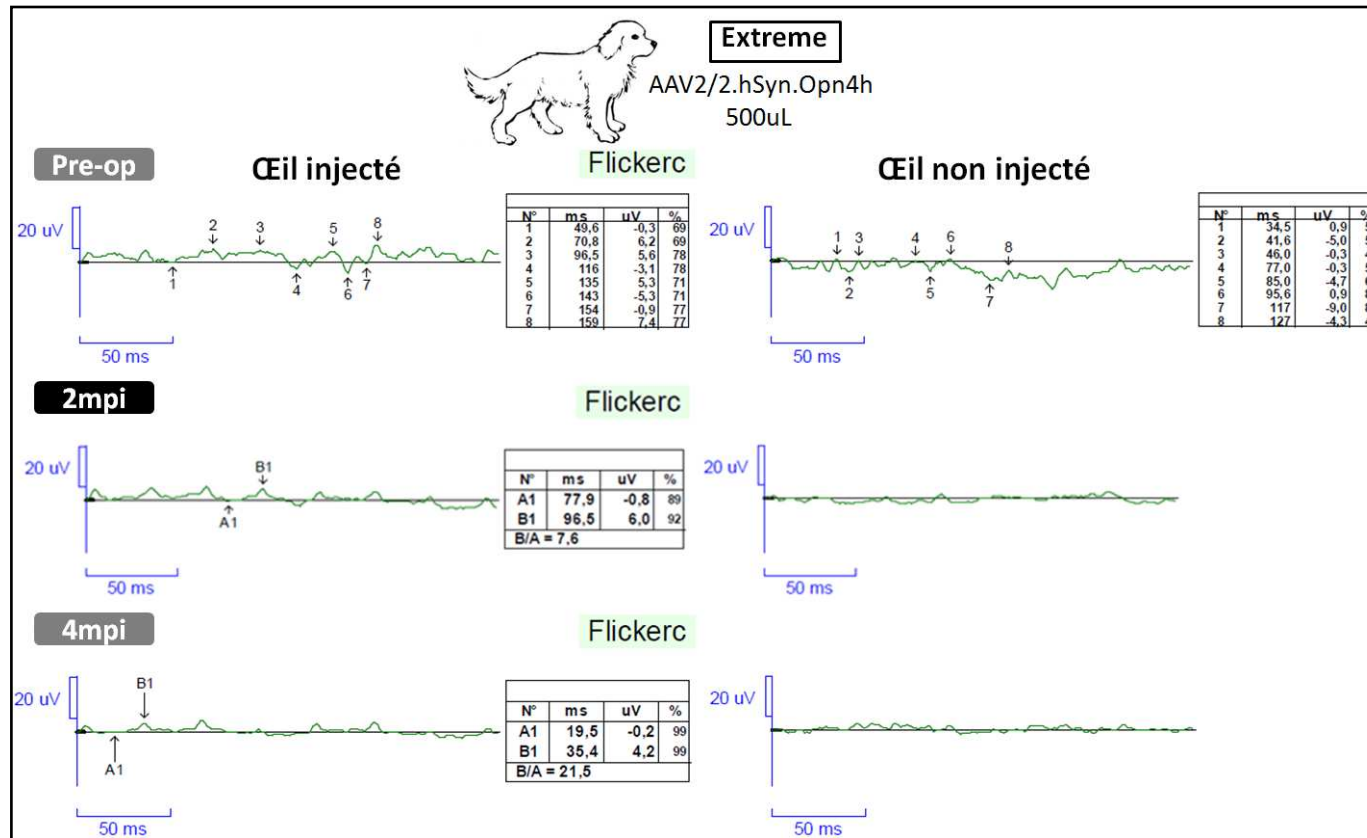


Figure 28: Evaluation des fonctions rétiniennes par électroretinographie du chien Extreme Rpe65^{-/-} injecté avec le vecteur rAAV2/2.hSyn.Opn4h

Tracés bruts de la réponse électrique rétinienne en condition flicker 30Hz, avant injection (Pre-op) puis à 2 mois (2mpi) et 4 mois post-injection (4mpi). Chien Rpe65^{-/-} Extreme, injecté à l'âge de 4.5 ans, [1.6x10¹¹] vg/ml.

3. Mise au point d'une évaluation en potentiel évoqué visuel (PEV) avec implantation des électrodes en position épidurale ou sous-durale.

Dans les différentes publications portant sur le transfert d'optogènes chez des modèles rongeurs de DRH, la principale technique utilisée pour évaluer une éventuelle restauration des fonctions visuelles *in vivo* est le PEV (Tomita et al. 2007, Buskamp et al. 2010, Gaub et al. 2015, Mace et al. 2015). Ainsi après l'évaluation des fonctions rétinienne en ERG, nous avons voulu mettre au point une évaluation des fonctions corticales par PEV chez nos chiens. A ma connaissance, il n'existe aucune publication concernant une étude PEV chez des modèles canins de DRH.

Avant de tenter de mettre au point cette approche que nous n'avons jamais entreprise au laboratoire, nous avons voulu vérifier que nous étions capables de recueillir les réponses corticales de rats sains à la lumière après implantation épidurale des électrodes de recueillement. A noter que nous avons privilégié dans un premier temps l'implantation en position épidurale, bien moins invasive que l'implantation des électrodes sous la dure-mère. Nous avons réussi, après stimulation lumineuse bilatérale de $3 \text{ cd}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, à obtenir une réponse corticale de $20 \mu\text{v}$ chez nos rats sains (Fig. 29 C). Selon la même approche, le recueillement des signaux PEV d'un chien sain (beagle) s'est avéré beaucoup plus difficile puisque nous n'avons obtenu que des amplitudes d'environ $5 \mu\text{v}$, soit des réponses à la limite du seuil de détection (Fig. 29 C). Ainsi, nous n'avons pas réussi à reproduire les résultats obtenus dans une étude démontrant qu'il est possible, chez des chiens sains, d'enregistrer des signaux PEV d'une amplitude de près de $30 \mu\text{v}$ (Majji et al. 1999). Ces très faibles amplitudes, comparées à celles enregistrées chez le rat, s'expliquent peut-être par l'épaisseur de l'os crânien chez le chien ainsi que par l'épaisse couche musculaire recouvrant la boîte crânienne. À ces deux facteurs s'ajoute un basculement du cerveau du chien, amenant le cortex visuel derrière la nuque et contribuant ainsi à augmenter encore la distance entre les électrodes et le cortex visuel. A tel point que l'évaluation des signaux PEV chez un chien *Rpe65*^{-/-}, Formica, traité sur l'œil droit par thérapie génique de remplacement (AAV2/5.pRpe65.RPE65), et présentant une restauration partielle des fonctions visuelles (ERG, test de comportement), n'a pas été possible (Fig. 29 C).

Dans le but de détecter des signaux PEV plus amples, la décision a été prise d'implanter des électrodes de recueillement (Fig. 29 A) sous la dure-mère, en regard du cortex visuel (Fig. 29 B). Cette approche a déjà été décrite chez des chiens sains, et permettrait d'augmenter significativement la sensibilité des mesures (Margalit et al. 2003). Le premier chien à avoir été analysé de cette manière est le chien beagle sain iPomme, déjà injecté sur l'œil droit avec le vecteur AAV2.hSyn.Opn4h et présentant des réponses ERG normales sur les deux yeux. Ainsi il nous a été possible d'enregistrer des réponses PEV d'une amplitude de $12 \mu\text{v}$ (Fig. 29 D) soit plus du double des $5 \mu\text{v}$ obtenues après

implantation des électrodes en position épidurale. L'expérience a ensuite été renouvelée chez le chien sain Iowa. Sans que nous puissions en expliquer les raisons, nous n'avons pas réussi à reproduire nos résultats chez ce chien sain (Fig. 29 D). En effet, le profil des tracés bruts obtenus après positionnement des électrodes sous durales chez le chien Iowa était aberrant et non reproductible durant les différentes séances d'analyse à 2 et 4 semaines après l'implantation. Il en a été de même pour l'analyse du chien Formica, traité par thérapie génique de remplacement, qui n'avait pas non plus présenté de réponse électrique après implantation épidurale (Fig. 29 D).

Ainsi, et quelle que soit l'origine de ces résultats non reproductibles, l'étude PEV n'a pas été poursuivie pour l'analyse des chiens Rpe65^{-/-} ayant reçu un transfert d'optogènes, faute de résultat concluant sur les chiens contrôles.

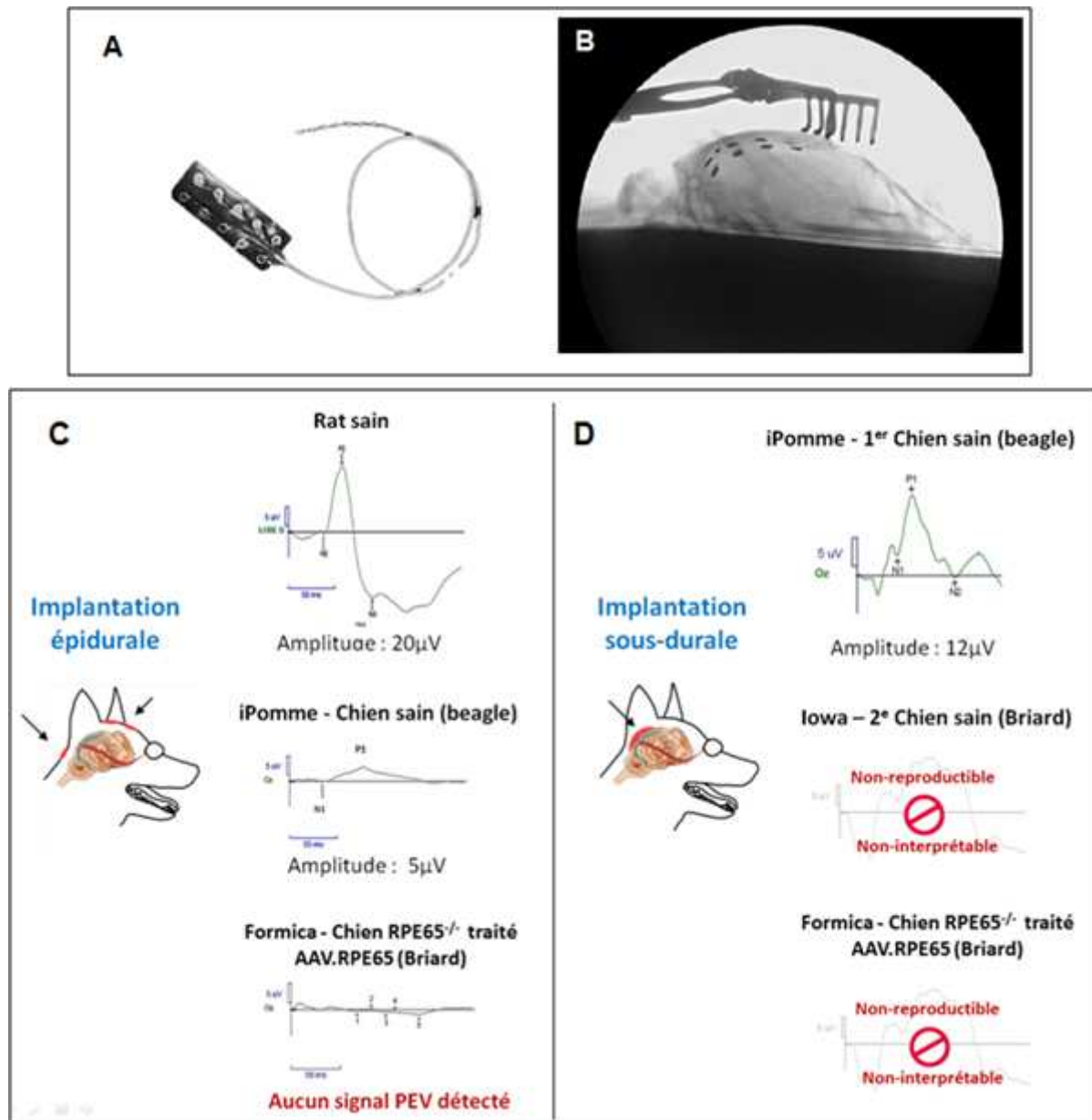


Figure 29: Evaluations des réponses corticales de modèles rongeurs et canins par enregistrement du potentiel évoqué visuel.

(A) Electrodes de recueillement (Ad-Tech Medical Instruments, Racine, WI, USA) des potentiels évoqués visuels (PEVs). (B) Radiographie permettant de vérifier le positionnement des électrodes implantées sous la dure-mère chez un modèle canin. (C-D) Enregistrements effectués suite à une stimulation lumineuse de 3 cd.s.m⁻². (C) Tracés bruts des PEVs enregistrés avec les électrodes en position épidurale chez un rat sain, un chien sain, et un chien Rpe65^{-/-} traité par thérapie génique de remplacement et présentant des réponses rétiniennees en ERG sur l'œil injecté. (D) Enregistrements obtenus après implantation des électrodes en position sous-durale chez des modèles canins sains.

4. Mise en place d'un test de comportement canin basé sur une perception lumineuse.

Le test de comportement visuel est schématisé en Figure 30 A. La première question lors de l'établissement d'un tel test est de savoir si un chien, que l'on sait avoir des capacités visuelles, peut comprendre et réussir le test plusieurs fois de façon consécutive. Il nous faut aussi savoir si le test comporte des biais (chaleur de l'ampoule, odeur de l'expérimentateur...) pouvant compromettre les résultats. Pour ce faire, l'utilisation d'un premier chien Rpe65^{-/-}, Gugus, déjà traité sur un œil par thérapie génique d'addition spécifique apparaissait comme un contrôle parfait pour répondre à ces questions. En effet, ses capacités visuelles sur l'œil traité lui permettent de comprendre le test et de le réussir, alors que l'absence d'activité électrique dans l'œil controlatéral représente un contrôle négatif permettant de prouver qu'en absence de vision le taux de réussite est égal au hasard (50%). À noter que l'utilisation de lentille opaque permet de restreindre la vision du chien à un seul œil.

Les résultats des trois séances de tests de comportement avec le chien Gugus ont été additionnés (Fig. 30 B). Les conditions "coque sur l'œil droit" et "coque sur l'œil gauche" ont été étalées sur les trois séances, alors que la condition "coque sur les deux" n'a été réalisée que durant les deux premières. Le taux de réussite de 5/8, quand des lentilles opaques sont placées sur les deux yeux, est proche du taux de réussite lié au hasard, ce qui tend à prouver qu'il n'y a pas d'autre facteur que la lumière qui puisse permettre au chien de réussir le test.

Quand le chien utilise son œil droit traité pour se déplacer, il réussit systématiquement le test (Fig. 32B). On peut en conclure qu'un chien avec des capacités visuelles est capable de comprendre et de réussir ce test d'association basé sur la lumière. Nous avons ensuite placé la lentille opaque sur l'œil traité et avons donc testé l'œil malade de ce chien âgé de plus de 3 ans. Dans ces conditions, et alors que son œil malade ne présente plus d'activité ERG détectable depuis plus de 2 ans, le chien Gugus a systématiquement réussi le test. Puisque l'hypothèse d'un biais a été écartée, cela nous amène à conclure que ce chien dispose encore de capacités visuelles sur son œil malade non traité, même si elles ne sont pas détectables en ERG.

Avant de conclure que malgré l'absence de signaux ERG détectables, tous nos chiens Rpe65^{-/-} conservent une perception basale à long terme, nous avons décidé de tester un autre chien en test de comportement. Ayant maintenant pour but de savoir si nos chiens déficients sont capables de réussir ce test en absence de traitement, nous avons évalué le chien Jerk. Au moment de ces tests de comportement le chien Rpe65^{-/-} Jerk était âgé de 11 mois, ne présentait plus de fonction ERG détectable, et n'avait pas encore été injecté. Les résultats obtenus chez ce chien sont en tout point identique avec ceux du chien Gugus (données non montrées), à savoir des taux de réussite de 100% sur les deux yeux déficients (non injectés).

Il est maintenant clair que malgré l'absence de signaux ERG détectables, nos chiens Rpe65^{-/-} conservent une perception basale jusqu'à l'âge de 3 ans minimum. N'ayant pu établir les contrôles négatifs nécessaire à la mise au point du test (impossibilité de discriminer les chiens traités et les chiens non traités), les chiens Rpe65^{-/-} traités par transfert d'optogènes n'ont pas été évalués par test de comportement.

**Gugus - Chien Rpe65^{-/-}**

Age : 4 ans
OD : AAV2/5.pRpe65.Rpe65
OG : Non injecté

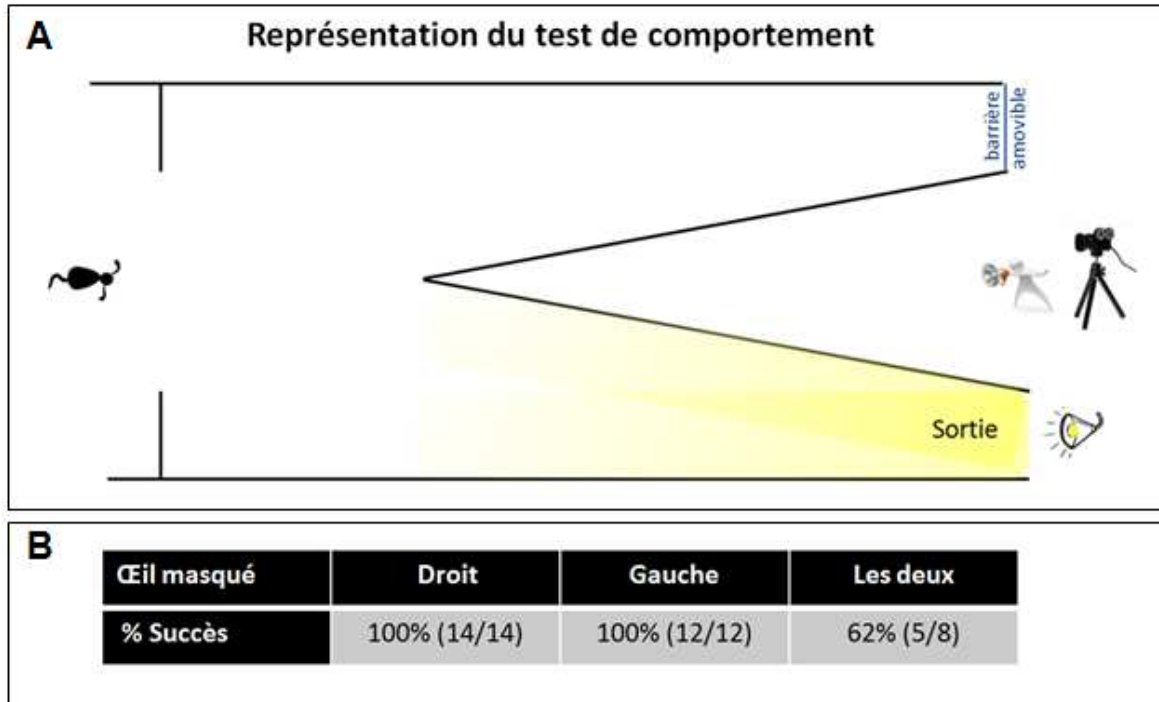


Figure 30: Evaluation de la vision basée sur un test de comportement visuel, chez un chien Rpe65^{-/-} traité sur l'oeil droit avec un vecteur AAV2/5.Rpe65.

(A) Représentation du test de comportement. Le chien est préalablement placé à l'obscurité et maintenu par un expérimentateur en début de parcours, comme représenté sur la figure. Aléatoirement, un des deux couloirs est fermé à l'aide d'une barrière amovible par un second expérimentateur situé au niveau de la caméra. La lumière est placée au niveau de la sortie opposée. Toujours à l'obscurité, le second expérimentateur, masqué derrière les panneaux, lance le film puis allume la lumière (480 lux). Le 1^{er} expérimentateur laisse alors le chien libre de son parcours. Le test est comptabilisé quand le chien a franchi de tout son corps la limite séparant les deux couloirs. (B) Taux de réussite selon l'emplacement de la lentille opaque. L'œil traité du chien Gugus présente des fonctions rétinienne en ERG, aucune activité rétinienne n'est détectable sur l'œil gauche non traité.

5. Evaluation de l'expression des produits du transgène après transfert d'optogènes chez le chien Rpe65^{-/-}.

L'évaluation de la transcription des transgènes Opn4c, Opn4h et eNpHR a été réalisée par RT-PCR après extraction et rétro-transcription des rétines transduites et des rétines controlatérales non injectées des chiens correspondants. Pour les chiens ayant reçus les vecteurs contenant une cassette d'expression ChR2, l'analyse de la recherche des produits du transgène s'est faite par immunohistochimie sur rétine montée à plat.

-Optogène Opn4 canin

Pour l'optogène Opn4 canin, il est impossible de mettre en évidence la présence du produit du transgène indépendamment des transcrits endogènes puisque les deux séquences sont strictement identiques (Fig. 31 C).

-Optogène eNpHR

Pour l'optogène eNpHR, deux chiens déficients ont reçu l'injection du vecteur correspondant. Cependant l'un des deux chiens, Jazzy, a dû être sacrifié suite à un décollement rétinien total consécutif à la chirurgie. Il nous a semblé peu pertinent d'évaluer l'éventuel transfert d'optogènes dans ces conditions. Ainsi seul un chien ayant été injecté avec un vecteur rAAV2 codant pour l'optogène eNpHR, Fripon, a été analysé par RT-PCR. Ce chien, injecté à l'âge de 4 ans, et sacrifié à 18 mois post-injection ne présente pas de transcrit eNpHR détectable sur l'œil injecté (Fig. 31 E). Cette absence d'amplification n'est pas liée à une erreur dans le protocole de l'expérience puisque le contrôle endogène est détecté. Elle n'est pas non plus liée aux conditions de PCR puisque le contrôle positif avec le plasmide vecteur correspondant est bien amplifié. L'intégralité de l'expérience (extraction, traitement DNase, Rétro-transcription, amplification PCR) a été répétée une seconde fois avec le même résultat négatif.

-Optogène Opn4 humain

Pour l'optogène Opn4h, quatre chiens ont été injectés avec le vecteur rAAV2 correspondant. Pour trois de ces chiens les rétines ont été analysées par RT-PCR. Ainsi le chien Extreme, âgé de 4 ans et demi au moment de l'injection, et décédé à 10 mois post-injection, nous permet de confirmer la présence de transcrits Opn4h suite au transfert d'optogènes, dans la rétine traitée uniquement (Fig. 31 D). Les rétines des deux autres chiens, Jobi et Guess, injectées avec le vecteur rAAV2.hSyn.Opn4h, ont fait l'objet d'une analyse par puce MEA (micro électrodes en ligne) avant d'être congelées puis analysées par RT-PCR. Ainsi, il s'est écoulé 3 jours entre le sacrifice des chiens et l'extraction des ARNs. Malgré ces conditions expérimentales moins favorables que la congélation des rétines

directement après le sacrifice, l'analyse par RT-PCR des rétines s'est avérée toujours envisageable puisque nous avons pu confirmer la détection d'un gène canin endogène des cellules ganglionnaires pour ces deux chiens, Jobi et Guess (Figs. 31 B). De plus, l'amplification de l'optogène *Opn4h* a pu être possible dans l'œil injecté du chien Jobi, à 20 mpi, après analyse MEA (Fig. 31 A). Cependant nous n'avons pas réussi à amplifier de transcrit *Opn4h* sur l'œil injecté du chien Guess, à 21 mpi, après analyse MEA (Fig. 31 B).

-Optogène ChR2

Pour l'optogène ChR2, quatre chiens ont été injectés avec le vecteur rAAV2 correspondant. L'ensemble de leurs rétines a été analysée, par immunomarquage dirigé contre le transgène ChR2, en microscopie confocale. Cependant, pour deux de ces chiens, Eroïne et Jolly, les marquages ont eu lieu directement après sacrifice des animaux, alors que pour les deux autres, Jerk et Juvamine, les marquages ont été réalisés après évaluation par des puces MEA (avec toutes les limitations précédemment décrites quant aux conclusions à tirer de ces résultats). Pour ces deux derniers, le marquage s'est limité aux zones évaluées en MEA (4 zones de 10 mm² environ par rétine). Dans l'optique de ce paragraphe visant à démontrer que le vecteur thérapeutique conduit à l'expression de l'optogène contenu dans sa cassette d'expression, il est préférable de se focaliser sur les analyses confocales des deux chiens Eroïne et Jolly dont l'ensemble de la rétine a été marqué en IF. Ces analyses ont permis de conclure à l'expression de l'optogène ChR2 dans les cellules ganglionnaires de ces deux chiens déficients (Figs. 32 et 33). On y distingue, comme chez le rat, le rassemblement des axones des cellules transduites vers la papille alors que les somas des cellules sont principalement localisés en périphérie (Fig. 32). A noter que chez ces deux chiens, les zones de transduction ne couvrent pas l'ensemble de la rétine et ne se retrouvent pas sur les 4 pétales montés à plat. Bien qu'il n'y ait pas eu de comptage précis, il semble que les zones de transduction chez ces deux chiens couvrent au plus 20% de la surface rétinienne.

En résumé de ce paragraphe, nous avons pu mettre en évidence que le transfert de l'optogène *Opn4* canin et de l'optogène *Opn4* humain a conduit à la transcription du transgène optogénétique dans la neurorétine des chiens *Rpe65*^{-/-}. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de transcrit *eNpHR* pour l'unique chien déficient analysé (20mpi) bien que nous y sommes parvenus chez un chien sain (7 mpi). Enfin, nous avons pu observer l'expression, en microscopie confocale, des protéines ChR2 dans les cellules ganglionnaires des chiens *Rpe65*^{-/-} jusqu'à 21 mois après l'injection.

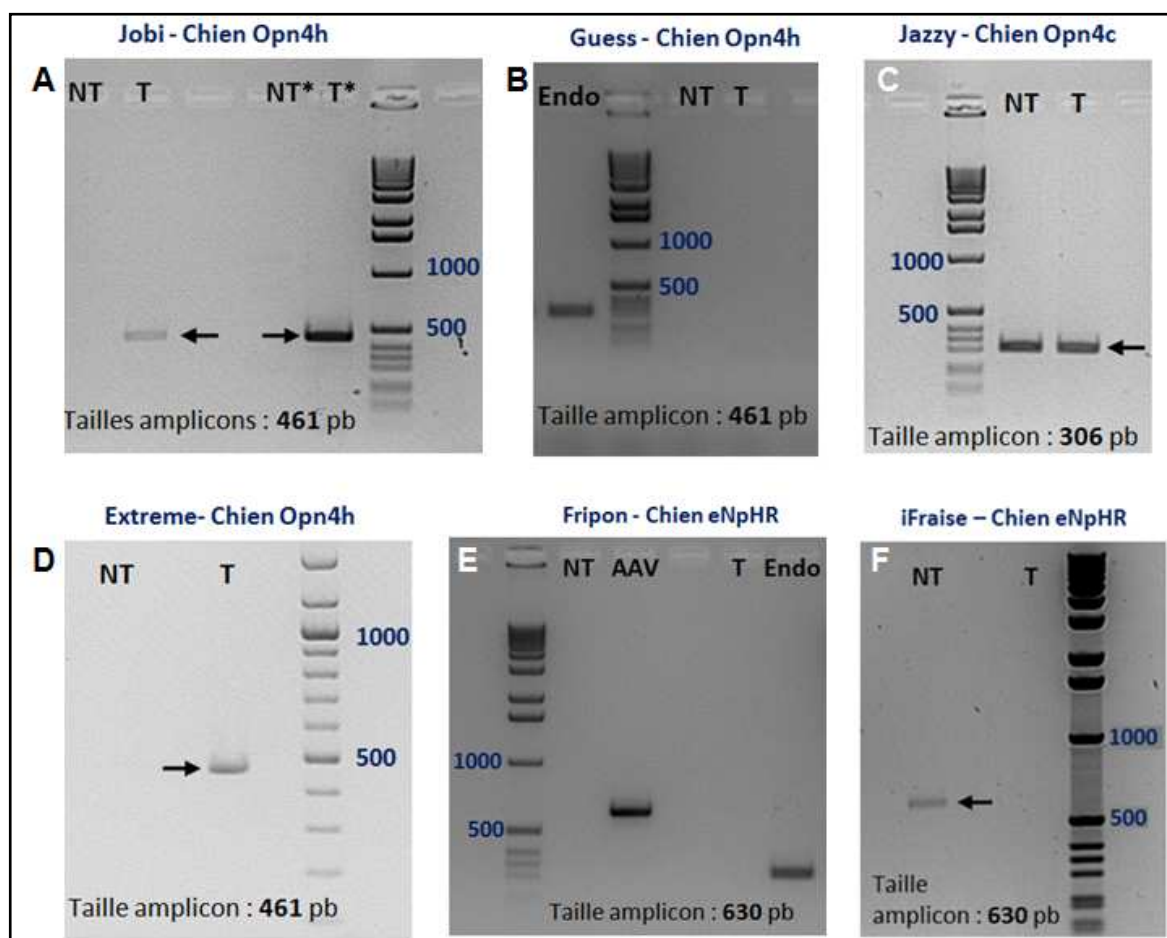


Figure 31: Validation de la transcription des transgènes optogénétiques, par RT-PCR, après transfert d'optogènes chez des modèles canins.

Electrophorèses des produits de RT-PCR extraits à partir de neurorétines de chiens, (A-E) *Rpe65*^{-/-} ou (F) sain, injectés avec un des vecteurs recombinants codant pour un optogène. Les extractions d'ARN sont réalisées sur des rétines prélevées à (A) 20 mois post-injection (mpi), (B) 21 mpi, (C) 16 mpi, (D) 10mpi, (E) 18 mpi et à (F) 7mpi pour ce chien sain. Pour les conditions n'ayant pas permis l'amplification du transgène, un contrôle endogène (*Opn4c*) d'une taille attendue de 306pb a été réalisé pour valider l'intégralité du protocole d'extraction - RT-PCR. À noter que les conditions (A) et (B) ont été réalisées suite à un protocole MEA, comme détaillé dans les figures 35 et 36. NT : œil non traité ; T : œil traité ; Plasm : contrôle positif avec plasmide contenant la cassette d'expression. Endo : transcrit endogène ; NT*/T* : Analyse de la zone rétinienne supérieure uniquement.

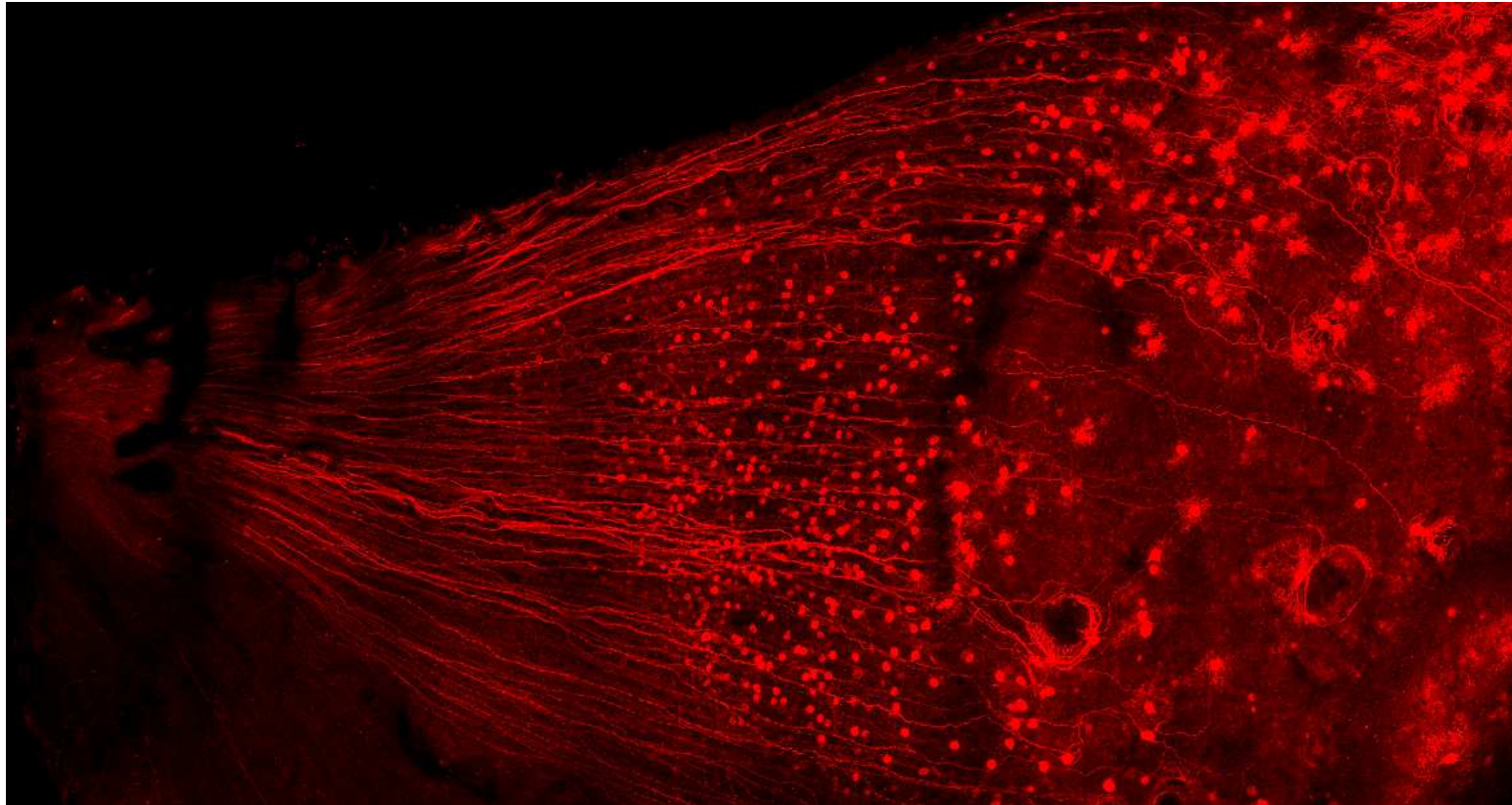


Figure 32: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans la couche des cellules ganglionnaires du chien Eroïne déficient pour le gène Rpe65.

Image confocale d'une rétine en montage à plat présentant une expression étendue de l'optogène channelrhodopsine-2 dans le quart de rétine nasale supérieure d'un chien Rpe65^{-/-} (Eroïne) injecté à l'âge de 4 ans, et sacrifié 21 mois post-injection. La procédure chirurgicale est composée d'une vitrectomie avant l'injection par voie intravitréenne du vecteur recombinant ($500\mu\text{l}$, $2 \times 10^{11} \text{ vg.ml}^{-1}$). Grossissement x20.

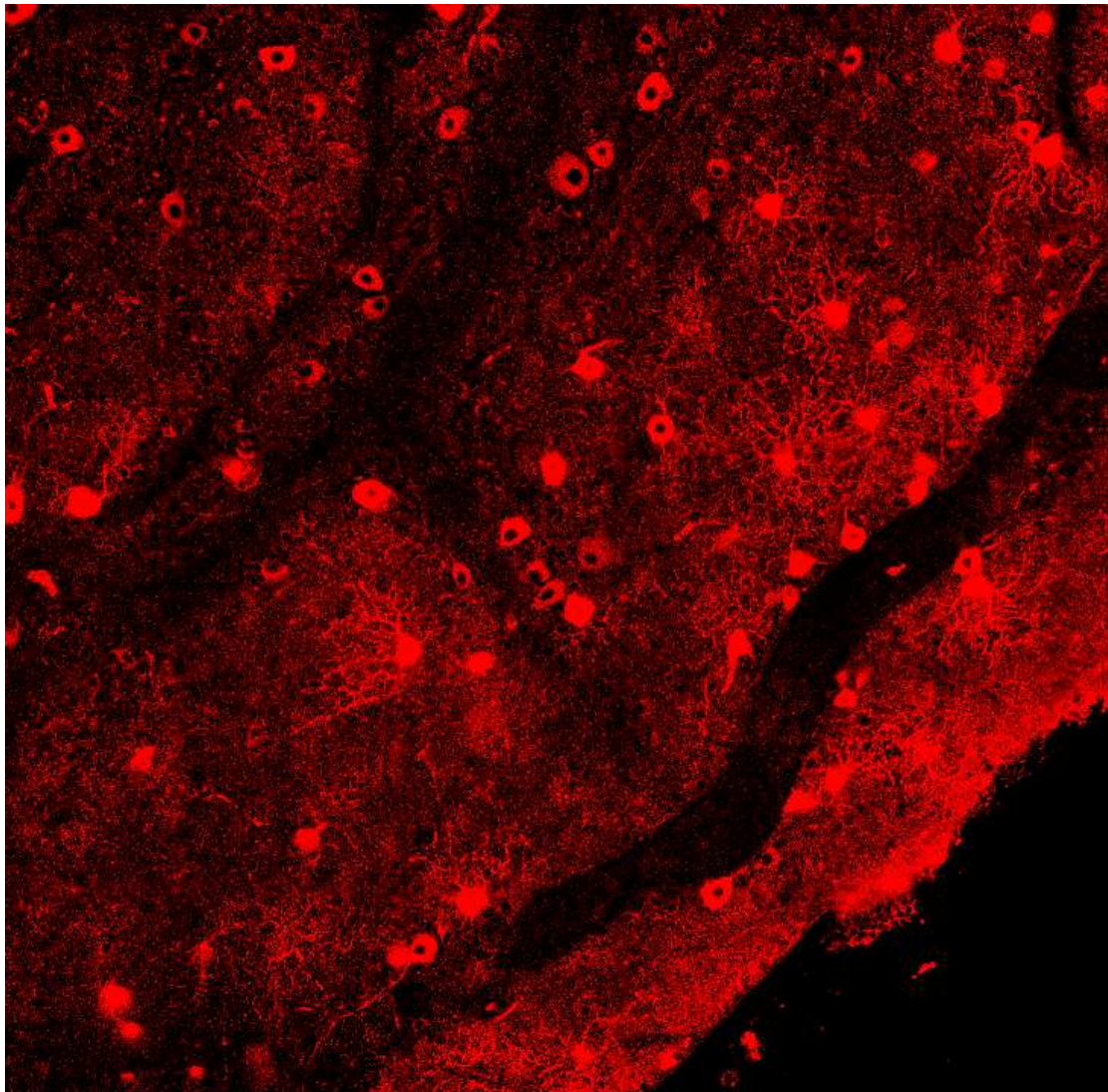


Figure 33: Profil de transduction d'un vecteur rAAV2/2 hSyn.ChR2 dans les cellules ganglionnaires du chien Jolly, déficient pour le gène Rpe65.

Image confocale d'une rétine en montage à plat présentant une expression étendue de l'optogène channelrhodopsine-2 dans la partie temporale inférieure de la rétine (mi distance entre la papille et la périphérie) d'un chien Rpe65^{-/-} (Jolly), injecté à l'âge de 15 mois, et sacrifié 9 mois post-injection. La procédure chirurgicale est composée d'une vitrectomie avant l'injection par voie intravitréenne du vecteur recombinant (1ml, 2×10^{11} vg.ml⁻¹). Grossissement x30.

6. Evaluation *ex vivo* de la restauration des fonctions rétinienne par analyse à l'aide d'une puce de micro électrodes en ligne (MEA) de la réponse des cellules ganglionnaires canines à des stimulations lumineuses.

L'analyse par puce MEA consiste à mesurer *ex vivo* la variation des fréquences des potentiels d'action des cellules ganglionnaires suite à une stimulation de la rétine à la lumière. Nous avons testé cette approche sur les rétines de deux chiens injectés avec des vecteurs codant pour l'optogène ChR2 et de deux chiens injectés avec des vecteurs codant pour l'optogène Opn4h.

Il n'est techniquement pas possible d'analyser l'ensemble du tissu rétinien par cette technique, de fait, seules 4 zones de 10mm² environ ont été analysées par rétine (Fig. 34). Nos cassettes d'expression AAV ne contenant pas de gène rapporteur, et nos optogènes n'étant pas fusionnés avec des protéines fluorescentes, nous n'avons pas de moyen d'anticiper quelles zones sont les plus transduites sur les rétines injectées. Ainsi, nous nous sommes basés sur les profils de transduction observés en microscopie confocale lors d'expériences précédentes (Tshilenge et al. 2016 ; Figs. 32 et 33 du manuscrit) pour choisir au mieux les 4 zones que l'on estime les plus favorables à une analyse par puce MEA. En conséquence, nous avons systématiquement analysé des zones situées à mi-distance entre la papille et la périphérie pour chaque quart de rétine, comme illustré sur la figure 34. A défaut de pouvoir localiser les zones de transduction avant analyse MEA, tous les fragments de rétine testés ont été analysés à posteriori par RT-PCR (Chiens Opn4h) ou par IF (Chiens ChR2) dans le but de rechercher l'expression des produits du transgène correspondant et ainsi confronter ces résultats à ceux obtenus par puce MEA.

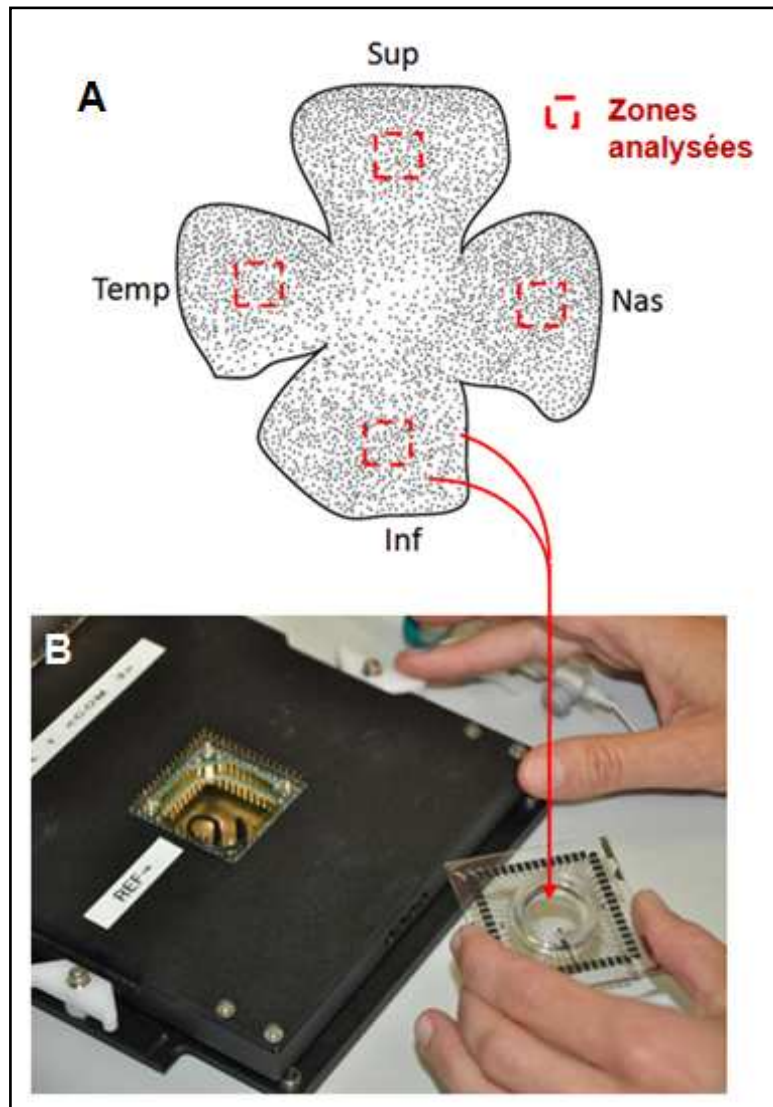


Figure 34: Représentation des zones rétinienne analysées par puce MEA.

(A) Localisation des 4 zones analysées, chacune de 10 mm² environ, et situées à mi-distance entre la papille et la périphérie de la rétine. (B) Image du support contenant la puce MEA de 4mm², fixée au fond du puits. MEA : micro électrodes en ligne. Sup : zone supérieure ; Inf : zone inférieure ; Temp : zone temporelle ; Nas : zone nasale.

-Optogène Opn4h , Chien Jobi

Les résultats de ces expériences ont conduit à la détection d'une photosensibilité des cellules ganglionnaires (en zone supérieure), sur l'œil injecté avec un vecteur hSyn.Opn4h, du chien Jobi (Fig. 35 A à F). De nombreux contrôles ont été mis en place pour préciser la nature de cette photosensibilité détectée au niveau des cellules ganglionnaires. Ainsi, on observe que la stimulation à la lumière bleue (480nm, 10s) de la neurorétine injectée conduit à l'augmentation des fréquences des potentiels d'action (PA) des cellules ganglionnaires (Fig. 35 A), suivie par une baisse progressive des fréquences avant un retour à l'état de repos. Chaque stimulation successive, espacée de 180s, conduit à une augmentation des fréquences des PA strictement corrélée à la stimulation. Ces événements ont été observés sur plusieurs dizaines de cellules ganglionnaires en zone supérieure (Fig. 35 B et C). Des stimulations lumineuses dans le rouge (600nm, 10s), hors du spectre d'absorption de la mélanopsine humaine, n'ont aucun effet sur les fréquences des potentiels d'action de ces mêmes cellules ganglionnaires (Fig. 35 D). Pour exclure que les réponses observées au niveau des ganglionnaires, suite à une stimulation bleue, proviennent de l'activation de photorécepteurs survivants (il en reste forcément quelques-uns puisque les chiens réussissent les tests de comportement) nous avons utilisé des bloqueurs glutamatergiques (LAP4, CNQX, CPP). Ces drogues bloquent les synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires ainsi que les synapses entre les cellules bipolaires de cônes et les cellules ganglionnaires. Ainsi, le maintien de la photosensibilité des cellules ganglionnaires à des stimulations bleues, en présence de ce cocktail de bloqueurs (Fig. 35 E), nous confirme que les cellules ganglionnaires répondent indépendamment des photorécepteurs et même des cellules bipolaires potentiellement transduites par transfert d'optogènes. En tant que contrôle négatif de cette expérience, la zone supérieure de l'œil controlatéral du chien Jobi a été analysée le même jour, en présence du même cocktail de drogues. Aucune variation de la fréquence des PA des cellules ganglionnaires n'a été observée, sur plus d'une centaine de cellules analysées (Fig. 35 F). Aucune réponse corrélée à la lumière n'a été enregistrée sur les trois autres zones de l'œil injecté du chien Jobi.

Toutes les zones des deux yeux de ce même chien ont été analysées par RT-PCR après extraction des ARNs. A savoir que les zones supérieures de chaque rétine ont été analysées séparément (NT*/T*), des trois autres de chaque rétine qui ont été rassemblées en un même échantillon (NT/T), (Fig. 35 G). On remarque que les transcrits Opn4h ne sont détectés que sur l'œil injecté, en quantité plus forte sur la zone supérieure que sur le regroupement des trois autres zones analysées. Il est délicat de tirer des conclusions concernant la présence de transcrits Opn4h sur les trois autres zones alors qu'aucune cellule ganglionnaire répondeuse par MEA n'a été détectée dans ces mêmes zones. On peut émettre l'hypothèse que la sensibilité de la PCR est telle qu'elle permet d'amplifier un faible

nombre de transcrits *Opn4h*, alors que ces mêmes zones ont peut-être été trop faiblement transduites, ou que le taux d'expression par cellule a été trop faible dans ces zones, pour permettre d'enregistrer une fonctionnalité par MEA. Cette expérience de RT-PCR permet surtout de confirmer que dans les zones où l'on a trouvé des cellules photosensibles, il y a bien eu transfert de l'optogène *Opn4h*.

-Optogène *Opn4h* , Chien Guess

Le chien Guess a également été injecté avec le vecteur codant pour l'optogène *opn4h*, puis sacrifié à 21 mois post-injection, pour permettre l'analyse par puce MEA de ses rétines. Ce chien est l'un des deux chiens ayant eu une restauration transitoire des fonctions ERG à 1 et 2 mois post-injection (Fig. 27). Cependant, aucune variation de la fréquence des PA des cellules ganglionnaires, corrélée aux stimuli lumineux bleus, n'a été détectée par MEA sur les zones analysées de chacun des deux yeux (Fig. 36 A). Sur ce graphe on remarque des variations de fréquence des PA mais celles-ci ne sont pas corrélées avec la stimulation lumineuse et ne sont donc pas médiées par l'action d'optogènes.

Les rétines ont ensuite été analysées par RT-PCR dans le but de rechercher la présence de transcrits *Opn4h*. Cependant, aucun transcrit *opn4* humain n'a été détecté dans les zones analysées de ce chien sacrifié 21 mois après injection (Fig. 36 B). De ce fait, l'absence d'amplification de transcrits *Opn4h* est en adéquation avec l'absence de photosensibilité des cellules ganglionnaires observées en MEA. On ne sait pas si l'absence d'ARN codant pour la mélanopsine humaine à 21 mois post-injection est liée à une perte d'expression du transgène, ou à l'analyse de zones situées en dehors des zones de transduction dont nous n'avons pas moyen de prédire avec précision la localisation. La restauration partielle des fonctions ERG durant les premiers mois suivant l'injection laisse à penser qu'un transfert d'optogènes a bien eu lieu, au début de l'étude, quelque part dans la neurorétine de l'œil injecté du chien Guess.

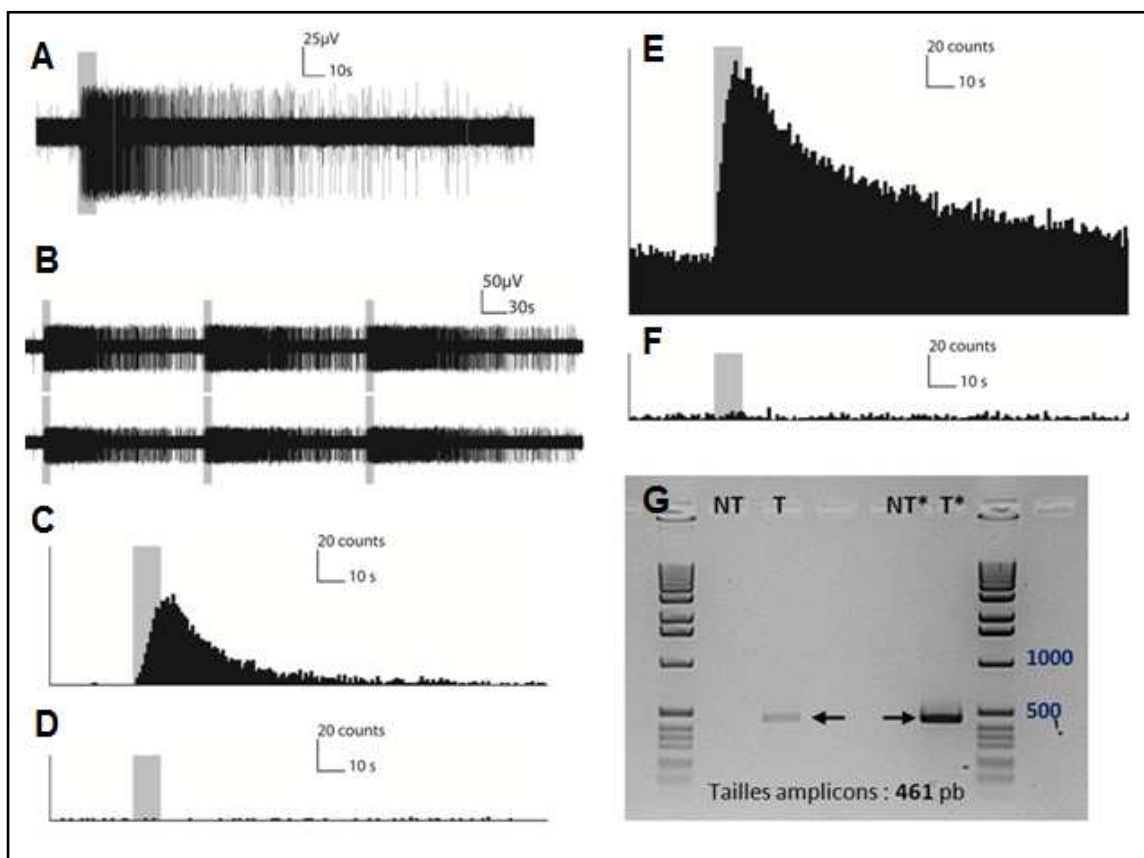


Figure 35: Restauration de la photosensibilité de la rétine du chien Jobi $Rpe65^{-/-}$ après transfert de l'optogène *opn4h* au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.

(A-B) Résultats bruts de la réponse (A) d'une ou (B) plusieurs cellules ganglionnaires après stimulation à la lumière bleue (480nm) de 10s (bande grisée), par analyse avec une puce MEA (micro électrodes en ligne) de la zone supérieure de l'œil traité.

(C-F) Histogrammes de réponses PSTHs (peristimulus time histograms) avec un bin d'une seconde, dans les conditions expérimentales suivantes : (C) Œil injecté, zone supérieure, flash bleu 480nm. (D) Œil injecté, zone supérieure, flash rouge 600nm. (E) Œil injecté, zone supérieure, flash bleu 480nm, avec bloqueurs glutamatergiques. (F) Œil controlatérale non injecté, zone supérieure, flash bleu 480nm. (G) Electrophorèse des produits de RT-PCR de la neurorétine de l'œil traité (T, T*) et de l'œil non traité (NT, NT*) du chien Jobi. Les zones supérieures ont été extraites et analysées séparément (NT*, T*) alors que les trois autres zones (inférieure, temporale et nasale) ont été extraites et analysées ensemble (NT, T).

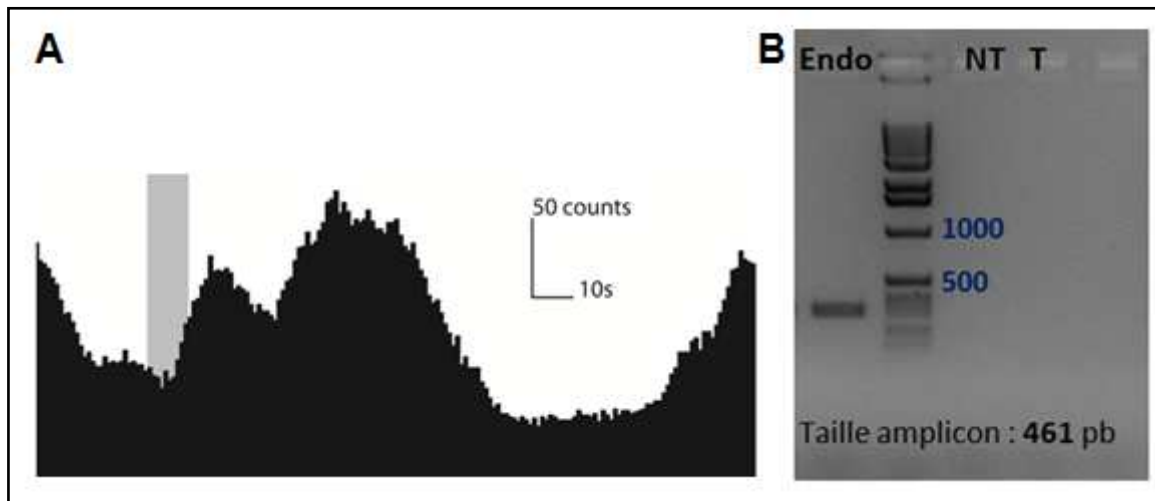


Figure 36: Absence de restauration de la photosensibilité de la rétine du chien Guess $Rpe65^{-/-}$ après transfert de l'optogène *opn4h* au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.

(A) Histogrammes de réponses PSTHs (peristimulus time histograms) avec un bin d'une seconde, d'une cellule ganglionnaire en zone nasale de l'œil injecté du chien Guess, analysée par puce MEA (micro électrodes en ligne). En grisé, la phase de stimulation de 10s à la lumière bleue 480nm. (B) Electrophorèse des produits de RT-PCR issus de la neurorétine de l'œil traité (T) et de l'œil non traité (NT) du chien Guess injecté avec l'optogène *Opn4h*. Les 4 zones d'un même œil, ayant préalablement été analysées par MEA, ont été extraites et analysées ensemble. PCR réalisée en présence d'un contrôle positif (Endo, transcrit *Opn4c* endogène de 306pb).

-Optogène ChR2, Chiens Jerk et Juvamine

Chez les chiens Jerk et Juvamine, les neurorétines qui ont été injectées avec un vecteur codant pour l'optogène ChR2 ont aussi été analysées par puce MEA. Aucune photosensibilité des cellules ganglionnaires, n'a pu être enregistrée sur les différentes zones testées des rétines de ces deux chiens (Fig. 37 A et B). Les fragments de rétine issus des évaluations par puce MEA ont été marqués à l'aide d'anticorps dirigés contre l'optogène ChR2, puis analysés par microscopie confocale. Sur l'ensemble des morceaux de rétine analysés par puce MEA de ces deux chiens, nous n'avons quasiment pas remarqué la présence de cellules ganglionnaires marquées (Fig.37 C et D, rétines des yeux injectés). Pour ces expériences aussi il est important de rappeler que la fixation des tissus n'a eu lieu que 3 jours après le sacrifice des animaux (temps de l'analyse MEA) et que les marquages immunohistochimiques n'ont eu lieu que plusieurs jours après la fixation. Ces conditions expérimentales sont moins favorables à la détection de signaux spécifiques. En ce sens, nous avons d'ailleurs remarqué que les très rares cellules marquées par l'anticorps anti-ChR2 l'étaient uniquement au niveau du soma, alors que les chiens Eroïne et Jolly, dont la fixation et le marquage étaient consécutifs au sacrifice (Figs. 32 et 33), présentaient des cellules marquées au niveau du soma mais aussi souvent au niveau de l'arborisation dendritique et des axones.

En résumé des études menées à l'aide des puces MEA, on peut souligner que le transfert de l'optogène opn4 humain est très probablement à l'origine de la photosensibilité des cellules ganglionnaires exprimant les transcrits *Opn4h*, à 20 mois post-injection, sur l'œil traité du chien Jobi. Alors que le chien Guess dont les rétines ont été analysées par puce MEA à 21 mois post-injection, ne présente ni expression du transgène *Opn4h* (dans les zones analysées) ni présence de cellules ganglionnaires photosensibles. Pour les deux chiens ayant été administrés avec le vecteur codant l'optogène ChR2, les analyses MEA n'ont pas permis de mettre en évidence une sensibilité des cellules ganglionnaires vis-à-vis de la lumière. Les zones analysées sont dépourvues de cellules ganglionnaires exprimant la protéine ChR2 chez ces deux chiens, Jerk et Juvamine, sacrifiés respectivement à 13 et 7 mois post-injection.

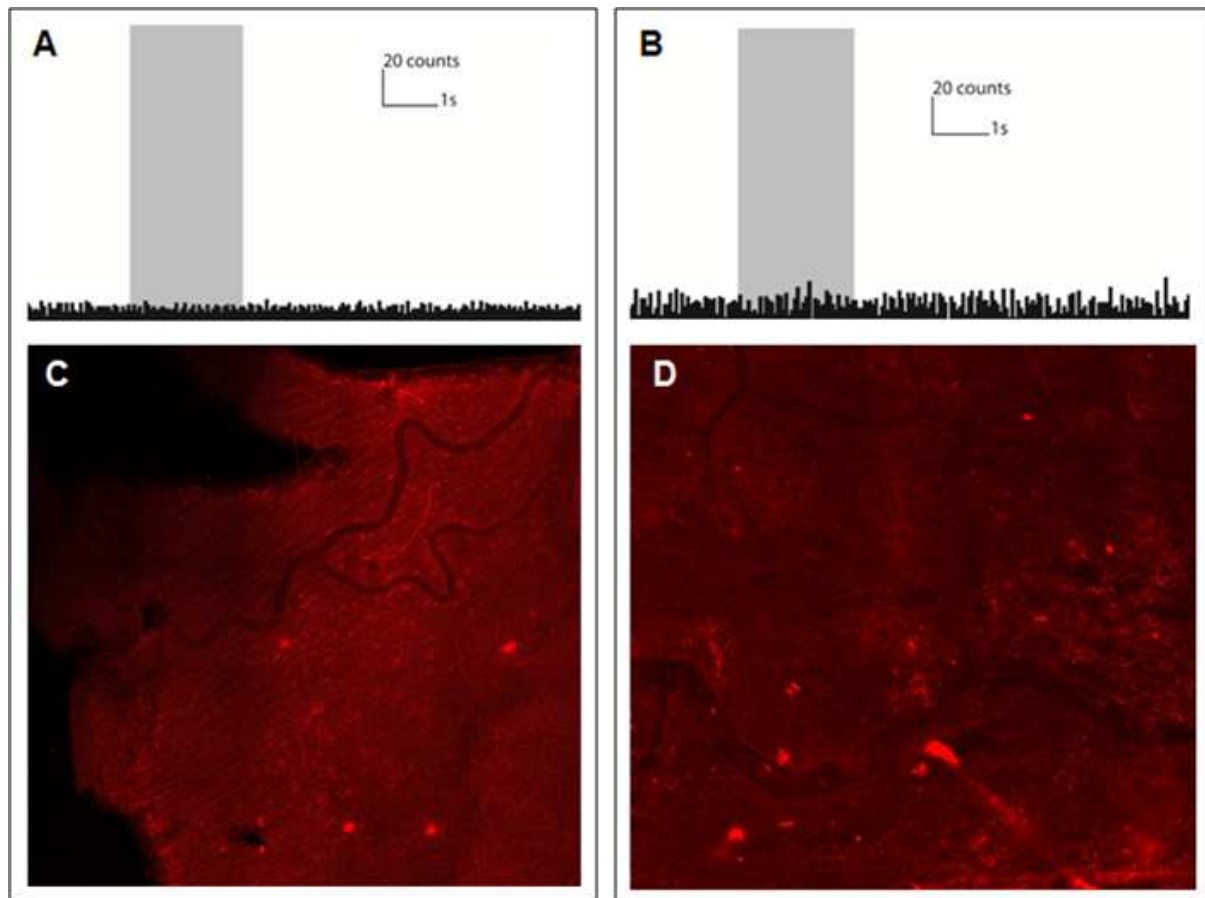


Figure 37: Absence de restauration de la photosensibilité de la rétine des chiens $Rpe65^{-/-}$ Juvamine et Jerk, après transfert de l'optogène ChR2 au niveau des cellules ganglionnaires rétinienne.

(A-B) Histogrammes de réponses PSTHs (peristimulus time histograms) avec un bin d'une seconde et des phases de stimulation de 2s à la lumière bleue 470nm (grisé), suite à une analyse par puce MEA (micro électrodes en ligne). (A) Analyse d'une cellule ganglionnaire en zone supérieure de l'œil injecté du chien Juvamine. (B) Analyse d'une cellule ganglionnaire en zone nasale de l'œil injecté du chien Jerk. (C-D) Images confocales de rétines en montage à plat après immunomarquage dirigé contre l'optogène ChR2 (Progen, réf 651180). La procédure chirurgicale est composée d'une vitrectomie, avant l'injection par voie intravitréenne du vecteur recombinant (1ml, 2×10^{11} vg.ml⁻¹). 2000 μm, x20. (C) Zone supérieure de la rétine, préalablement analysée en MEA, du chien Juvamine à 7 mois post-injection. (D) Zone inférieure de la rétine, préalablement analysée en MEA, du chien Jerk à 13 mois post-injection.

7. Etude de la tolérance du transfert d'optogènes par voie intravitréenne chez des chiens déficients pour le gène Rpe65.

L'étude de la tolérance du transfert d'optogènes a lieu tout au long du projet au moyen d'un suivi funduscopique et d'enregistrements par tomographie à cohérence optique en domaine spectral (sd-OCT) pour l'ensemble des chiens administrés. Ces analyses ont été effectuées avant et à 1, 2, 3 et à plus de 6 mois post-injection. À noter qu'un suivi régulier en fond d'œil a aussi eu lieu dans les jours qui ont suivi l'injection (2,4, 7 et 15 jours post-injection). Aucun signe de toxicité observable en fond d'œil (dilatation des vaisseaux, autofluorescence) n'a été remarqué suite à l'injection des vecteurs recombinants par voie intravitréenne, après vitrectomie par échange d'air, dans la rétine des chiens Rpe65^{-/-} (données non montrées).

Les enregistrements sd-OCT ont permis de suivre avec précision l'épaisseur des rétines de chaque chien, de manière non invasive. À noter que la présence de cataractes ne permet pas d'avoir un suivi sd-OCT sur les yeux concernés. De ce fait, les yeux controlatéraux des chiens Eroïne et Jerk n'ont pas pu être suivis par sd-OCT. La figure 38 représente l'analyse du suivi de l'épaisseur rétinienne totale avant et à plus de 8 mois post-injection entre l'œil injecté et l'œil non injecté. Ces analyses portent sur les zones temporales supérieures (Fig. 38 A) et les zones nasales supérieures (Fig. 38 B) de trois chiens injectés avec le vecteur codant pour l'optogène Chr2 (Eroïne, Jerk, Juvamine), deux chiens injectés avec le vecteur codant pour l'optogène Opn4h (Guess, Jobi) et d'un chien injecté avec le vecteur codant pour l'optogène eNpHR (Fripon). Les figures 39 et 40 permettent de visualiser où sont situées les zones prises en compte pour le calcul de l'épaisseur (carrées violets) de 2 des 6 analysées en figure 38 (les zones d'analyse sont sensiblement les mêmes entre les différents chiens).

On observe que l'évolution de l'épaisseur rétinienne ne change pas au cours du temps entre l'œil injecté et non injecté, aussi bien en zone supérieure temporale que nasale, à l'exception du chien Fripon. En effet, l'œil du chien Fripon injecté avec le vecteur AAV2.hSyn.eNpHR présente une diminution d'épaisseur importante (21% de l'épaisseur totale), 14 mois après injection en zone temporale supérieure de l'œil traité uniquement. La figure 39 montre les enregistrements sd-OCT de ce chien qui ont servi à l'analyse, avec l'emplacement des zones de comptage. On remarque que la zone de comptage en zone temporale supérieure "post-op" se trouve dans une zone de moindre épaisseur peu représentative du reste de la rétine supérieure. En regardant l'évolution globale des deux yeux (Fig. 38), on ne remarque pas de baisse notable de l'épaisseur liée à l'injection.

À noter que le chien Fripon a vu sa rétine endommagée à la suite de la chirurgie, ce que l'on remarque par la zone très localisée de plus faible épaisseur en rétine centrale. Cette altération, probablement due à l'injection trop rapide du vecteur, se remarque aussi sur les enregistrements sd-

OCT des chiens ayant subi une hémorragie rétinienne lors de la chirurgie (chiens Jumbe et Jobi ;Tab. 3). Un trou dans la neurorétine n'a cependant pas empêché le chien Jobi d'avoir un transfert d'optogènes permettant une réactivation des cellules ganglionnaires à la lumière, comme observé par analyse MEA en zone périphérique supérieure de l'œil injecté.

Le suivi des enregistrements sd-OCT du chien Fripon, bien qu'intéressant, reste un cas particulier peu représentatif de l'ensemble des sd-OCT effectué sur les 11 chiens de l'étude injectés avec des optogènes. La figure 40, présentant les enregistrements sd-OCT du chien Guess avant et à 15 mois post-injection, est plus représentative des résultats observés après transfert d'optogènes. A savoir que nous n'avons pas remarqué de diminution de l'épaisseur totale de la rétine liée à une toxicité faisant suite au transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires des chiens *Rpe65^{-/-}*. Ces résultats sont en adéquation avec les observations funduscopiques et nous permettent de conclure que le transfert de ces quatre optogènes dans les cellules ganglionnaires canines n'entraîne aucune toxicité apparente.

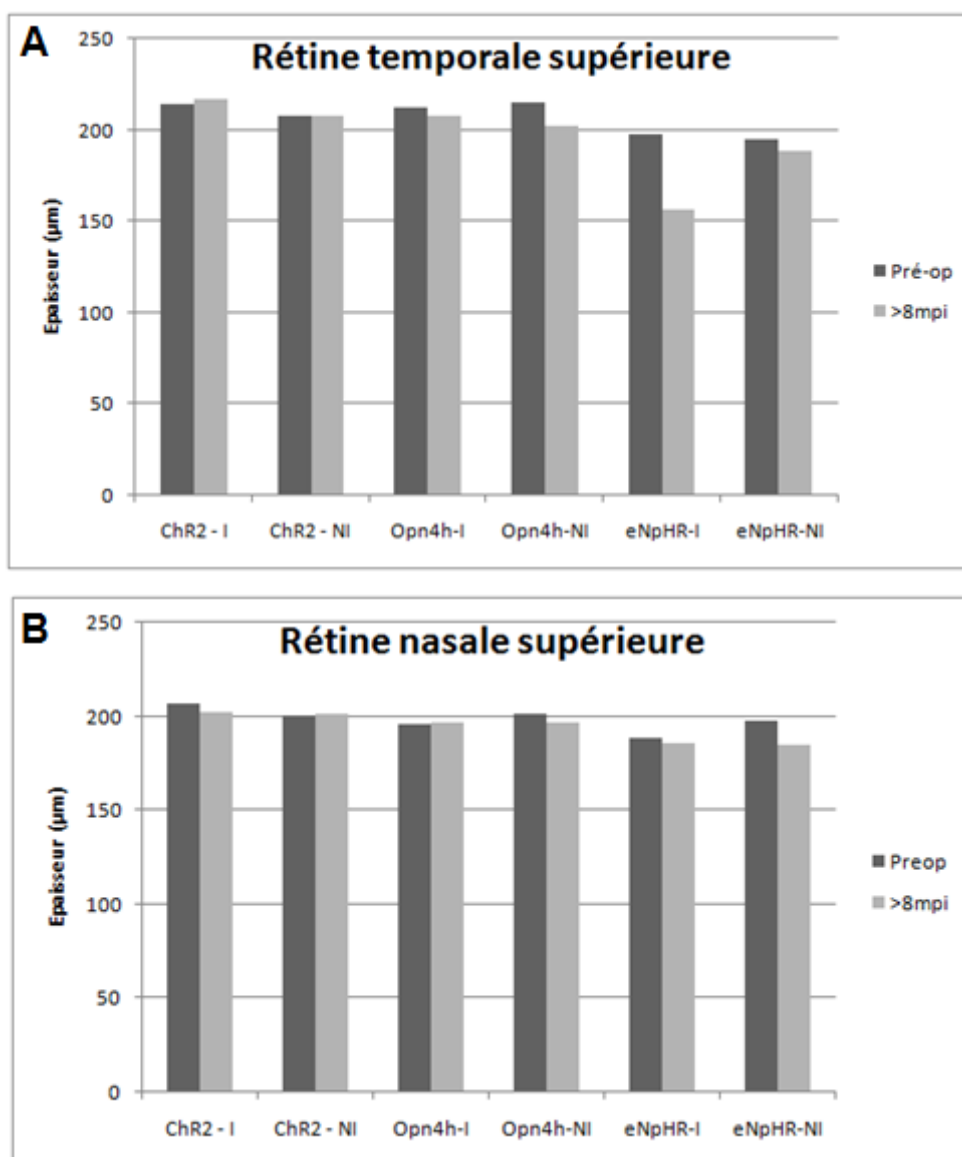


Figure 38: Comparaison de l'épaisseur des rétines de chiens $Rpe65^{-/-}$, avant et plus de 8 mois après transfert des optogènes Opn4h, ChR2 et eNpHR.

Evaluation de l'épaisseur des rétines par tomographie à cohérence optique par domaine spectral (sd-OCT) pour 3 chiens injectés avec un vecteur codant pour l'optogène ChR2 (Eroïne, Jerk, Juvamine), 2 chiens avec un vecteur codant pour l'optogène Opn4h (Guess, Jobi) et 1 chien avec un vecteur codant pour l'optogène eNpHR (Fripon). Deux zones ont été prises en considération par comptage: (A) zone temporale supérieure et (B) zone temporale inférieure, comme illustré dans les figures 39 et 40. optogène-NI : œil non injecté ; optogène-I : œil injecté ; Preop : avant injection ; mpi : mois post-injection.

Fripon - Chien eNpHR

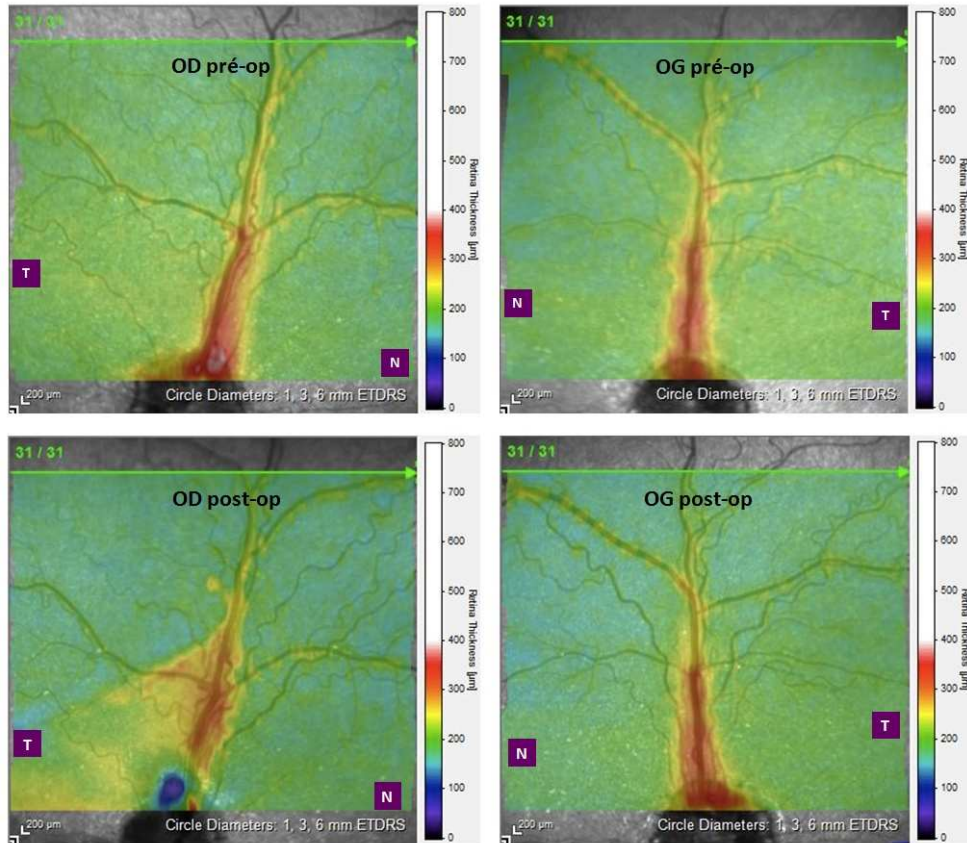


Figure 39: Comparaison de l'épaisseur de la rétine du chien Fripon Rpe65^{-/-}, avant et 14 mois après transfert de l'optogène eNpHR.

Visualisation de l'épaisseur de la rétine supérieure par tomographie à cohérence optique en domaine spectral (sd-OCT) selon un dégradé de couleurs chaud-froid. Le chien Fripon Rpe65^{-/-} était âgé de 4 ans lors de l'administration du traitement sur l'œil droit (500μl, 1.6x10¹¹ vg.ml⁻¹). Les carrés violets indiquent les zones de comptage prises en compte pour la figure 38. N : zone nasale ; T : zone temporale ; pré-op : avant injection ; post-op : post-opération.

Guess - Chien Opn4h

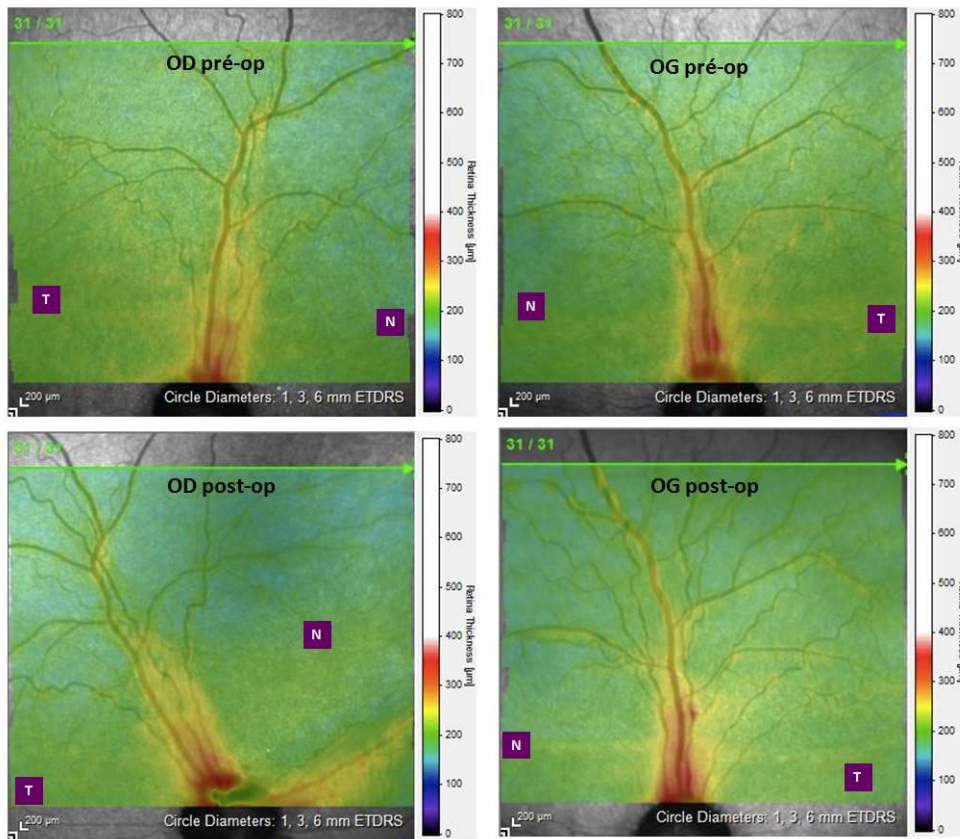


Figure 40: Comparaison de l'épaisseur de la rétine du chien Guess Rpe65^{-/-}, avant et 15 mois après transfert de l'optogène Opn4h.

Visualisation de l'épaisseur de la rétine supérieure par tomographie à cohérence optique en domaine spectral (sd-OCT) selon un dégradé de couleurs chaud-froid. Le chien Guess Rpe65^{-/-} était âgé de 3 ans lors de l'administration du traitement sur l'œil droit (500µl, 1.6x10¹¹ vg.ml⁻¹). Les carrés violets indiquent les zones de comptage prises en compte pour la figure 38. N : zone nasale ; T : zone temporale ; pré-op : avant injection ; post-op : post-opération.

Conclusion des résultats de la partie optogénétique

OPN4 CANIN

On ne peut tirer que très peu de conclusions de l'unique chien déficient qui a reçu le vecteur codant pour la mélanopsine canine. N'ayant aucun moyen de discriminer les produits du transgène des transcrits endogènes, on ne sait donc pas si le transfert de gènes a été effectif. On a uniquement pu observer pour ce chien qu'il n'y a eu ni signe de toxicité apparent, ni restauration des fonctions ERG. L'injection de chiens supplémentaires serait nécessaire pour confirmer ces observations.

ENPHR

Trois chiens ont été injectés avec le vecteur correspondant (1 sain et 2 déficients). Un des deux chiens ayant eu une grave complication (détachement totale avec déchirure de la neurorétine) durant la chirurgie, il a dû être exclu de l'étude. Sur les deux chiens restants, aucun signe de toxicité lié au transgène n'a été observé. Bien que le chien sain présentait encore des transcrits eNpHR lors de son sacrifice (à 7 mpi), cela n'a pas été le cas de l'unique chien eNpHR déficient encore dans l'étude. Comme pour le chien Opn4c, ne pouvant pas prouver que le transfert de gènes a été effectif, il est difficile d'interpréter son absence de restauration ERG.

OPN4 HUMAIN

Dans le cas de l'optogène Opn4h, cinq chiens ont reçu un vecteur codant pour cet optogène (1 sain et 4 déficients). Aucun des chiens n'a présenté de signe de toxicité, et la présence des produits de transgène a été confirmée pour le chien sain (14 mpi). Deux des quatre chiens ont présenté une restauration d'ERG transitoire. Enfin, les rétines de deux chiens ont été évaluées *ex vivo* à l'aide de puces MEA. Pour l'un, l'absence de photosensibilité corrélée à l'absence de transcrits Opn4h sur les zones analysées ne nous permet pas de tirer de conclusion de cette évaluation. Ce chien étant l'un des deux chiens à avoir eu une restauration d'ERG, on peut supposer que le transfert de gènes a eu lieu en dehors des zones analysées par MEA mais cela reste une hypothèse. Pour le second chien, nous avons observé une photosensibilité des cellules ganglionnaires très probablement liée au transfert de l'optogène Opn4h, associé à l'expression du transgène. Ces résultats avec l'optogène Opn4h sont positifs et encourageants puisque deux chiens ont eu une restauration d'ERG et un chien présente une photosensibilité *ex vivo* des cellules ganglionnaires.

CHR2

Enfin les conclusions que l'on peut porter sur le transfert de l'optogène ChR2 dans les cellules ganglionnaires des quatre chiens Rpe65^{-/-} et du chien sain sont hélas encore très limitées. Le point le plus marquant est l'absence de toxicité apparente associée à un maintien à plus d'un an post-injection de l'expression de la protéine ChR2, sur les trois chiens dont la rétine a été analysée dans son intégralité. Nous n'avons pas de moyen d'expliquer l'absence de restauration de fonctions ERG même si cela avait déjà été constaté par d'autres. L'analyse par puce MEA de deux des chiens déficients injectés ne nous permet de tirer aucune conclusion puisque là encore, l'absence de cellule photosensible s'est faite sur des zones dépourvues d'optogène. Au regard des résultats ERG, le transfert de l'optogène ChR2 chez le chien Rpe65^{-/-} n'est pas en mesure de restaurer des fonctions rétiniennes détectables par cette technique. Il faudrait cependant prouver ce résultat par une seconde technique (par MEA par exemple) avant de conclure plus largement que le transfert de l'optogène ChR2 est inefficace chez le chien Rpe65^{-/-}.

- DISCUSSION -

Les stratégies de transfert d'optogènes sont des approches thérapeutiques innovantes qui ont déjà permis de rendre une perception visuelle à des modèles rongeurs de DRH. Le passage à des modèles grands animaux de DRH constitue une étape importante en vue d'un passage en clinique. Ce projet de thèse a cherché à évaluer la faisabilité du transfert d'optogènes dans les cellules ganglionnaires d'un modèle canin à dégénérescence lente, déficient pour le gène Rpe65.

EVALUATION DE L'INNOCUITE DES OPTOGENES

Le premier point important que l'on tire de l'étude est l'absence de signe apparent de toxicité suite à l'injection intravitréenne de vecteurs AAV2 codant pour l'un des optogènes ChR2, eNpHR, Opn4c ou Opn4h, sous promoteur spécifique hSyn (Fig. 38 ; fonds d'œil non montré). Ce résultat est en adéquation avec des études précédentes portant sur le transfert de l'optogène ChR2 dans les cellules ganglionnaires de rats RCS (Royal College of Surgeon), de souris rd10 (Doroudchi et al. 2011) ou de primates sains. En effet, des coupes histologiques de rétine de primates sains ne présentent aucune altération 3 mois après injection de l'optogène ChR2 (fusionné à la GFP) sous promoteur ubiquitaire fort (Ivanova et al. 2010). De même, l'étude de la réponse immunitaire de rats RCS, exprimant dans les cellules ganglionnaires l'optogène ChR2 fusionné à la protéine fluorescente Venus, montre des résultats en faveur d'une bonne tolérance de l'optogène (Sugano et al. 2011). En effet, la présence d'anticorps, dirigés contre le vecteur et contre l'optogène, est transitoire et à des concentrations 2.000 fois inférieures aux concentrations obtenues lors d'une immunisation avec un peptide dérivé de ChR2. Une élévation du ratio $CD4^+/CD8^+$, témoin d'une immuno-régulation, est observée entre 1 semaine et 1 mois post-injection suite à l'injection du vecteur contenant le transgène ChR2-Venus, mais aussi en présence du transgène Venus seul. Le recrutement de lymphocytes T ne serait donc pas lié à l'expression de la channelrhodopsine-2. De plus, cette élévation transitoire observée uniquement durant le premier mois après l'injection n'impacte pas les fonctions rétiniennes corticales restaurées par le transfert d'optogènes. L'expression du transgène et la restauration de fonctions corticales sont d'ailleurs maintenues durant toute la vie du modèle (étude jusqu'à 20 mois post-injection). Enfin, le marquage GFAP au niveau des cellules astrocytaires et des cellules gliales est même moindre après transfert de l'optogène ChR2, comparé à des rats RCS de même âge non injectés (Sugano et al. 2011, Isago et al. 2012). Nous souhaitons nous aussi poursuivre un peu plus

loin l'étude de la tolérance de ChR2 chez le chien $Rpe65^{-/-}$, au-delà de ce projet de thèse, notamment en recherchant la présence de facteurs pro-inflammatoires et d'anticorps dirigés contre cet optogène, dans la chambre antérieure, suite à l'injection. La channelrhodopsine, et ses homologues algaux (Sugano et al. 2016), sont les seuls optogènes dont la tolérance à été analysée chez des modèles de DRH. Ce sont les optogènes les plus étudiés et les plus proches de la clinique. Pour cause, depuis novembre 2015 la phase de recrutement pour un essai de phase I/II chez l'Homme, portant sur le transfert de l'optogène ChR2 dans les cellules ganglionnaires de patients atteints de rétinite pigmentaire, a commencé (NCT02556736, RetroSens Therapeutics). Le début des injections est d'ailleurs planifié pour le printemps 2017.

EVALUATION DES REPONSES ELECTRORETINOGRAPHIQUES

Lors de notre étude nous n'avons pas réussi à démontrer d'impact du transfert des optogènes eNpHR, Opn4c et ChR2 sur la restauration de fonction ERG (Tab. 5). Des résultats identiques ont été présentés suite au traitement de rats RCS avec un vecteur AAV2/2.CAG.ChR2 (Tomita et al. 2007)(Tomita et al. 2007). En effet dans cette étude, le transfert de l'optogène ChR2 dans les cellules ganglionnaires n'a pas conduit à la restauration de fonction rétinienne détectable en ERG durant les six semaines suivant l'injection. Aucune étude n'a démontré de restauration d'ERG suite au transfert de l'optogène ChR2 ou eNpHR. La très grande majorité des publications portant sur un transfert d'optogènes ne présente d'ailleurs pas d'étude de la réponse ERG suite au traitement (Bi et al. 2006, Lagali et al. 2008, Lin et al. 2008, Busskamp et al. 2010, Doroudchi et al. 2011, Gaub et al. 2014, Cehajic-Kapetanovic et al. 2015, Gaub et al. 2015, Mace et al. 2015), contrairement à ce qui est pourtant couramment entrepris suite au traitement de modèles de DRH basés sur d'autres formes de thérapie génique. Si cette évaluation de base n'est pas mise en avant dans les papiers faisant état d'un transfert d'optogènes réussi, cela me laisse à penser que les résultats obtenus en ERG étaient probablement négatifs.

Cependant, nous avons enregistré une restauration transitoire de fonctions ERG, à 1 et 2 mois post-injection, sur deux chiens déficients $Rpe65^{-/-}$, après transfert de l'optogène Opn4h (Figs. 27 et 28). Deux autres chiens $Rpe65^{-/-}$, qui ont été administrés avec le même vecteur, n'ont, eux, pas présenté de restauration de fonction rétinienne (Tab. 5). Les deux derniers chiens, sans restauration, étaient plus jeunes (moins de 8 mois contre plus de 3 ans) et ont reçu un volume de vecteurs plus important (2ml contre 0,5ml pour les chiens avec une restauration) (Tab. 3). N'ayant pas de raison de penser que ces différences limitent le bénéfice du transfert d'optogènes (bien au contraire), nous ne savons pas expliquer les différences de résultat observées. La restauration de fonctions ERG observée sur les

deux chiens plus âgés étant souvent proche de la limite de détection, peut-être qu'une transduction légèrement plus faible sur les deux chiens plus jeunes explique ces résultats négatifs. Cette transduction plus faible pourrait résulter d'une vitrectomie moins efficace chez les jeunes chiens ou d'une diffusion un peu moins importante des vecteurs dans les rétines encore intactes des chiens à 8 mois (Hernandez et al. 2010).

Bien que nous ne sachions pas expliquer l'origine de cette différence il est intéressant de noter que deux des trois publications qui témoignent d'une restauration d'ERG suite à un transfert d'optogènes, portent sur l'utilisation de l'optogène mélanopsine. Dans la première publication (Liu et al. 2016), la restauration d'ERG est transitoire et intervient 1 mois après le traitement d'une souris rd1. La perte de restauration dès le mois suivant est, selon les auteurs, liée à la perte d'expression du transgène. L'optogène *Opn4h* utilisé étant fusionné à l'eGFP, il est dommage que l'évaluation de la perte d'expression au cours du temps n'ait été pas réalisée *in vivo* par funduscopie sur un même animal. Cela aurait permis de limiter les variabilités interindividuelles, pouvant résulter d'un transfert de gènes plus ou moins efficace d'un individu à un autre (certaines injections sont parfois mieux réussies que d'autres). L'idée d'une perte de fonction consécutive à la perte d'expression avancée dans cette publication est en adéquation avec les résultats obtenus chez l'un de nos deux chiens présentant une restauration transitoire d'ERG. En effet, le chien *Rpe65^{-/-} Guess* dont les fonctions rétinienne en condition flicker ont atteints 12 μ v d'amplitude au cours des deux premiers mois post-injection, ne présentait plus lors de son sacrifice, à 21 mois post-injection, de transcrit *opn4h* détectable. À noter que la recherche de transcrits s'est limitée à 4 zones de 10 mm², après analyse MEA. On ne peut cependant pas exclure qu'il n'y ait eu d'autres zones de transduction, situées ailleurs sur la rétine et présentant encore des transcrits *opn4h* à 21 mpi, voire même des cellules ganglionnaires photosensibles. De plus, d'autres de nos résultats ne corroborent pas avec l'hypothèse d'une perte rapide de l'expression de l'optogène *Opn4h*. Pour le second chien ayant eu une restauration d'ERG durant les deux premiers mois suivant l'injection, le chien *Rpe65^{-/-} Extreme*, nous avons pu montrer la présence de transcrits *opn4h* à plus de 10 mois post-injection. La présence de transcrits *opn4h* a aussi pu être montrée à 20 mois après injection sur le chien Jobi. Celui-ci n'a pourtant pas eu de restauration d'ERG, mais nous avons pu démontrer la présence de cellules ganglionnaires photosensibles témoignant indirectement de la présence de mélanopsine humaine fonctionnelle. Ainsi la relation : perte d'expression de la mélanopsine - perte de la fonction ERG, mise en avant dans l'étude de *liu et al.*, n'est pas vérifiée dans notre étude.

La seconde publication faisant état d'une restauration d'ERG après transfert de l'optogène *Opn4* (van Wyk et al. 2015) porte sur une version de la mélanopsine murine fusionnée avec la protéine G normalement associée aux récepteurs glutamatergiques murins (*mGluR6*) des cellules bipolaires.

Dans leur étude, le transfert d'optogènes se fait dans les cellules bipolaires ON et conduit à la restauration de fonction ERG entre 2 et 8 mois post-injection (durée maximale de l'étude). Le maintien de la restauration observée par ERG est toujours effectif en présence d'un bloqueur des synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires (LAP-4), attestant que les enregistrements ne proviennent pas de photorécepteurs survivants mais bien du traitement. À noter que la fusion de la mélanopsine avec la protéine G des bipolaires ON a modifié l'effet polarisant de l'optogène Opn4. En effet, dans son rôle physiologique, l'activation de l'optogène Opn4 conduit à une dépolarisation cellulaire via l'ouverture de canaux calciques membranaires. Ici l'activation d'opn4 conduit à l'activation de la protéine G à laquelle il est couplé, qui, via une cascade d'activation, mène à la fermeture de canaux sodiques et donc à l'hyperpolarisation de la cellule bipolaire. Cela se traduit par l'observation d'une onde hyperpolarisante durant l'enregistrement ERG des souris rd1 traitées. Cette fusion est intéressante pour le futur des stratégies thérapeutiques basées sur un transfert d'optogènes car rares sont les optogènes induisant un effet hyperpolarisant (le seul autre étant à ma connaissance eNpHR). Celui-ci a en plus l'avantage d'être d'origine mammifère et déjà naturellement exprimé dans la rétine (en deux protéines distinctes).

On peut donc dire au vu de ces deux publications que la restauration de fonctions ERG après transfert de l'optogène opn4 est possible. Nous sommes d'ailleurs les premiers à observer un tel effet chez un modèle grand animal de DRH, même si celui est transitoire et se limite au transfert de l'optogène Opn4h (Fig.27 et 28). Il existe une troisième et dernière publication faisant état d'une restauration d'ERG après transfert d'optogènes (Tomita et al. 2014). L'optogène en question, mVChR1, ne fait pas parti des optogènes que nous avons testés. C'est un optogène optimisé sur sa séquence nucléotidique, résultant de la fusion de l'optogène ChR1 et d'un homologue de ChR2, *Volvox*, issu d'une autre algue. Le résultat de cette publication est notamment intéressant car il montre là encore que la restauration d'ERG peut être maintenue pendant plusieurs mois (12mpi). Reste que, concernant l'optogène ChR2, l'absence de résultat ERG suite au transfert d'optogènes est cohérente avec les résultats obtenus chez des rongeurs RCS, dans des conditions similaires aux nôtres (Tomita et al. 2007). Mais dans cette même étude, comme dans d'autres ne faisant pas mention d'une évaluation ERG qui a pourtant probablement été tentée sans succès, l'absence d'ERG est compensée par la preuve d'une réactivation des fonctions corticales, par potentiel évoqué visuel (PEV).

MISE EN PLACE DU POTENTIEL EVOQUE VISUEL CHEZ LE CHIEN

Dans l'étude de *Tomita et al.*, et en l'absence de fonction ERG détectable, les rats RCS traités par transfert de l'optogène ChR2 présentent une restauration des fonctions corticales en PEV pour des intensités lumineuses de 240 lux et plus. Au vue de cette publication et après avoir constaté l'absence de restauration ERG pour la plupart de nos chiens traités, nous avons voulu mettre en place ce même test. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à enregistrer des signaux amples et reproductibles chez nos chiens sains et notre chien déficient traité par thérapie génique de remplacement (Fig. 29 C et D). Nous avons pourtant réussi à mettre en place l'enregistrement d'ondes corticales spécifiques d'une stimulation lumineuse chez le rat (Fig. 29 C). Mais alors que l'enregistrement de signaux PEV chez le rongeur est simple et ne nécessite pas d'intervention chirurgicale, le basculement du cerveau du chien et l'importante épaisseur de muscle sur la boîte crânienne rendent trop peu accessible le cortex visuel pour permettre des enregistrements. L'implantation des électrodes sous la dure-mère n'a pas suffi à l'enregistrement de signaux électriques spécifiques des stimulations lumineuses. Il est possible que les signaux spécifiques recherchés aient été parasités par des ondes électro-encéphalographiques. En effet, dans la seule étude faisant état d'enregistrements PEV sous-duraux chez un modèle canin, il a été réalisé en parallèle un enregistrement des ondes EEG (Margalit et al. 2003). Cependant, bien qu'ils décrivent faire cet enregistrement dans leur matériel et méthode, il n'est pas précisé dans la publication s'ils ont constaté la présence d'ondes EEG parasites et si les tracés PEV qu'ils présentent ont été corrigés en conséquence.

Toujours est-il qu'en raison de notre incapacité à pouvoir mettre en évidence la réponse corticale de chiens avec des capacités visuelles, nous n'avons pas utilisé le PEV comme moyen d'étudier l'effet du transfert d'optogènes chez nos chien *Rpe65^{-/-}*. On peut noter que la seule publication faisant état d'un transfert d'optogènes réussi chez un modèle canin de DRH ne fait pas non plus mention d'étude PEV, ni d'ailleurs d'étude ERG (Gaub et al. 2014).

EVALUATION EX VIVO DU TRANSFERT D'OPTOGENES PAR PUCE MEA

Dans la publication de *Gaub et al.*, la preuve de la réussite du transfert d'optogènes chez le chien est faite par l'analyse d'explants rétiniens à l'aide d'une puce de micro électrodes en ligne (MEA, Micro Electrode Array). Ayant chacun entrepris une analyse par MEA, il est intéressant de confronter en détail leur étude à la nôtre. Leur démonstration se porte sur le modèle canin *rcd1* de rétinite pigmentaire, déficient pour le gène *Pde6* de la cascade de phototransduction des bâtonnets. Deux

chiens ont été traités par injection intravitréenne à l'aide d'un vecteur AAV2 (4YF) portant un transgène optogénétique LiGluR, sous promoteur fort ubiquitaire CAG. Au moins l'un des deux chiens a reçu une injection bilatérale puisque 3 explants traités sont analysés *ex vivo*. Ils ne font mention d'aucune procédure chirurgicale particulière (pas de vitrectomie, ni de vitréolyse enzymatique mentionnée). Les analyses sont faites entre 2 et 3 mois post-injection, sur des chiens âgés de 1,9 et 3,7 ans. Ils décrivent avoir ciblé, lors de l'injection, la zone centrale en vue d'une transduction de l'aeracentalis. Nous pouvons affirmer qu'à ces âges et dans cette zone, ces deux chiens $Pde6\beta^{-/-}$, bien que présentant une dégénérescence avancée ailleurs, possèdent encore une rétine composée des trois couches nucléaires (ONL, INL, GCL) (Pichard et al. 2016). Même si une partie des photorécepteurs a déjà dégénéré dans l'aeracentalis de ces deux chiens, la couche des cellules ganglionnaires sous-jacente est encore intègre et comparable à celle de nos chiens $Rpe65^{-/-}$ injectés (Le Meur et al. 2007, Pichard et al. 2016). La quantité de vecteurs génomes totaux injectés est comparable entre nos deux études.

L'optogène LiGluR est un optogène chimérique dérivé pour partie d'un récepteur au glutamate d'origine mammifère (Caporale et al. 2011). Cet optogène nécessite la liaison à un chromophore chimique ($MAG0_{460}$) pour être activable. Le couple LiGluR- $MAG0_{460}$ présente un pic d'absorption maximal à 455nm. La nécessité d'une supplémentation en chromophore représente un moyen de contrôle intéressant en étude *ex vivo* et *in vitro*, puisqu'elle permet de s'assurer que la restauration est bien médiée par le transfert d'optogènes (restauration observable uniquement après l'ajout du chromophore). Comme pour notre étude, leur cassette d'expression ne contient pas de gène rapporteur. Ils n'ont donc aucun moyen de prévoir les zones de transduction les plus favorables pour une analyse en MEA. Ils décrivent avoir analysé sur chaque rétine une zone d'environ 80 mm², localisée en rétine centrale supérieure (autour de l'aeracentalis), soit une surface deux fois supérieure à celle que nous avons étudiée. Cependant leur puce MEA étant composée de moins d'électrodes (4 fois moins que celle que nous avons utilisée), le nombre de cellules analysées par rétine est assez comparable entre nos deux études.

Lors de l'analyse, l'équipe de *Gaub et al.* démontre une photosensibilité des cellules ganglionnaires spécifiques de l'optogène LiGluR (absence de réponse à la lumière en absence du chromophore, utilisation de bloqueurs glutamatergiques). Ce résultat est obtenu après stimulation avec une intensité lumineuse de $1,7 \times 10^{17}$ photons. $s^{-1}.cm^{-2}$ d'une longueur d'onde de 470nm. A titre de comparaison, la photosensibilité observée sur la rétine supérieure du chien Jobi (Fig.35) a été observée après stimulations bleues (480nm) de 1×10^{17} photons. $s^{-1}.cm^{-2}$. Ces conditions expérimentales représentent des stimulations lumineuses très importantes quand on les rapporte à des situations de la vie de tous les jours. Cela équivaut à observer en direct les rayons du soleil (Fig.

13). Dans l'optique de démontrer que l'optogène LiGluR est toujours actif à des conditions lumineuses moins intenses, les auteurs rapportent qu'une photosensibilité des cellules ganglionnaires est toujours observée avec une stimulation de $1,9 \times 10^{15}$ photons. s^{-1} . cm^{-2} . Soit à une intensité lumineuse équivalente à l'éclairage d'une salle d'opération. Cependant, dans ces conditions les variations de fréquence des potentiels d'action des cellules ganglionnaires sont 6 fois moins importantes qu'avec des stimulations à $1,7 \times 10^{17}$ photons. s^{-1} . cm^{-2} . De plus, la longueur utilisée est passée de 470 nm à 445nm, soit au pic d'absorption du chromophore MAGO₄₆₀. Cela représente un désavantage car l'utilisation de cette longueur d'onde, encore un peu plus proche des ultraviolets, témoigne que le spectre d'absorption de cet optogène est centré dans le violet, et ne couvre donc pas de manière optimale le spectre lumineux du visible. On observe également que le profil des variations de fréquence, entre phase de stimulation et phase d'obscurité, est bien moins marqué. Enfin, Il est dommage que les contrôles de la spécificité de la réponse (en absence de chromophore et avec utilisation de bloqueurs métabotropiques) ne soient pas de nouveau entrepris à cette longueur d'onde. En effet, nous avons eu l'occasion d'observer durant nos séances d'analyse MEA, la présence de réponses endogènes suite à des stimulations dans le bleu à 470nm (chiens injectés avec les cassettes Chr2). Ces réponses, bloquées après l'ajout du bloqueur métabotropique LAP-4, étaient très probablement médiées par des cônes bleus (données non montrées). Ainsi avec l'utilisation d'une longueur d'onde de 445nm, encore plus proche du pic d'absorption des cônes S canins, situé entre 429 nm et 435 nm (Miller and Murphy 1995), les chances d'enregistrer des réponses endogènes augmentent. De plus, la présence de photorécepteurs cônes survivant à long terme dans l'aeracentalis (Pichard et al. 2016), qui est la zone analysée par les auteurs, renforce ce besoin d'un contrôle attestant de la spécificité de la réponse observée. Il aurait aussi été appréciable que les auteurs de l'article *Gaub et al*, précisent clairement si des cellules photosensibles avaient été retrouvées sur chacune des 3 rétines (les nombres d'échantillons étudiés, mis en avant dans les légendes des figures, font systématiquement référence à un nombre de cellules et pas à un nombre de rétines). J'aurais également aimé savoir pourquoi il n'y a pas eu d'étude de la 4ème rétine. Enfin, les auteurs n'ont pas précisé si des différences avaient été observées entre les deux chiens (dont l'âge, et donc les stades de dégénérescence, sont différents).

Même si certaines expériences mériteraient d'être plus détaillées, les résultats de cette étude permettent d'affirmer avec certitude, qu'au moins dans la condition lumineuse la plus intense, le transfert d'optogènes a permis de donner une photosensibilité aux cellules ganglionnaires de deux chiens rcd1 à l'aide de l'optogène LiGluR. Dans des conditions lumineuses comparables, nous avons aussi montré, pour un autre modèle de DRH, que le transfert d'optogènes peut conférer aux cellules ganglionnaires une photosensibilité indépendante des photorécepteurs (Fig. 35 A-F).

Cependant notre démonstration n'a concerné qu'un de nos deux chiens traités par transfert de l'optogène Opn4h, le chien Jobi. Les résultats négatifs du second chien, Guess, s'explique par l'absence d'expression du transgène optogénétique dans les zones analysées (Fig. 36).

Pour être tout à fait complet quant à la portée des conclusions que nous pouvons tirer de la photosensibilité des cellules ganglionnaires de notre chien Jobi, injecté avec le vecteur codant pour Opn4h, il me faut préciser qu'on ne peut pas exclure avec une certitude absolue que les signaux enregistrés ne proviennent pas de cellules ganglionnaires à mélanopsine endogènes. Il apparaît cependant comme très peu probable que cela soit le cas. En effet, nous n'avons jamais rencontré la moindre cellule ganglionnaire naturellement répondeuse à la lumière sur les 4 rétines non injectées analysées en MEA. Or plus d'une soixantaine de cellules ganglionnaires répondeuses était présente sur le fragment en rétine supérieure de l'œil injecté du chien Jobi (sur une surface d'environ 10 mm²). Bien qu'il n'y ait jamais eu, à ma connaissance, de comptage du nombre de cellules ganglionnaires à mélanopsine chez le chien (il n'y a d'ailleurs aucun anticorps disponible dirigé contre la protéine Opn4c permettant de marquer ces cellules), on sait que cette sous-population de cellules est très rare chez les primates. Environ 0,2% des cellules ganglionnaires totales expriment naturellement la mélanopsine chez le singe (3 milles cellules Opn4c⁺ sur 1,5 millions de cellules ganglionnaires), avec une densité d'environ 4 cellules ganglionnaires opn4⁺/mm² en rétine périphérique (Dacey et al. 2005). Ainsi, en se basant sur ces résultats provenant d'une rétine de taille et d'anatomie assez comparable (en périphérie du moins) à celle d'un chien, il y aurait statistiquement 40 cellules ganglionnaires à mélanopsine sur une surface de 10 mm², comme la zone supérieure périphérique analysée du chien Jobi. Ainsi, il apparaît extrêmement peu probable que la soixantaine de cellules photosensibles analysées dans cette zone soient toutes exclusivement des cellules endogènes. Alors que dans le même temps, nous n'avons jamais rencontré de cellule ganglionnaire naturellement répondeuse sur d'autres fragments et notamment sur le fragment controlatéral du même chien, analysé le même jour et dans les mêmes conditions.

Les résultats du chien Jobi sont très encourageants et nous devrions tester d'autres chiens injectés en MEA, sur des zones où nous serions sûrs que la transduction soit effective. Je ne parle pas uniquement de chiens ayant reçu un transfert de l'optogène Opn4h, mais aussi de ceux ayant reçu ChR2. L'absence de photosensibilité observée dans les rétines canines injectées avec un vecteur codant pour l'optogène ChR2, ne témoigne en rien de l'inefficacité de cet optogène à donner une photosensibilité, puisque les zones analysées étaient des zones non transduites (Fig. 37 C et D).

PISTE D'AMÉLIORATION POUR UNE POURSUITE DE L'ÉTUDE

Notre étude mériterait d'être poursuivie avec des optogènes couplés à des protéines fluorescentes comme cela est couramment le cas pour les études du transfert d'optogènes par MEA chez des modèles rongeurs de DRH (Bi et al. 2006, Lagali et al. 2008, Buskamp et al. 2010, Mace et al. 2015). Cela nous donnerait un moyen de localiser sur les rétines les zones de transduction et permettrait de focaliser l'évaluation sur ces zones que l'on saurait pertinentes. On pourrait même, avec des optogènes couplés à l'eGFP, avoir un suivi funduscopique et ainsi suivre *in vivo* l'expression du transgène dans le temps, dès le 7ème jour après injection grâce au promoteur hSyn (Fig. 24). Cela nécessiterait que l'expression soit suffisamment forte, mais nous en tirerions beaucoup d'informations concernant le maintien de l'expression des optogènes à long terme. Au regard des pertes d'expression des produits de transgènes que nous avons eu sur les chiens Fripon (eNpHR) et Guess (Opn4h, études des zones MEA uniquement) cela apparaît même primordial. On pourrait ainsi mettre en relation l'étendue de la transduction et les résultats des tests fonctionnels, et peut-être expliquer les absences de résultat constatées chez certains chiens. Enfin, grâce à la localisation des zones transduites apportée par le couplage, on pourrait envisager un suivi par micropérimétrie de ces régions d'intérêt et augmenter ainsi nos chances de détecter une restauration ERG suite au transfert d'optogènes.

Le couplage offre des perspectives très intéressantes, que nous avons déjà envisagées en début de projet. Si nous n'avons pas utilisé d'optogène fusionné c'est qu'avant l'injection des premiers chiens nous n'avions aucune certitude quant à la tolérance des optogènes (notamment ChR2 et eNpHR). Or, l'utilisation d'optogènes couplés à des protéines fluorescentes, provenant elles aussi de génomes algues (eGFP, eYFP), n'aurait pas permis de savoir à quelles protéines l'éventuelle toxicité aurait été imputable. Cette appréhension était renforcée par le fait que nous avons déjà constaté dans l'équipe que la surexpression d'eGFP, après transfert de gènes par injection sous-rétinienne, pouvait entraîner au bout de plusieurs semaines, une toxicité dans la rétine accompagnée d'une perte de cellules photoréceptrices. Avec le recul que nous avons maintenant, concernant l'expression de l'eGFP et à son absence de toxicité dans les cellules ganglionnaires canines (Tshilenge et al. 2016), le couplage des optogènes apparaît comme un choix très intéressant.

Un second axe d'amélioration serait à mon avis de continuer d'optimiser le geste chirurgical. Comme discuté dans notre publication *Tshilenge et al.*, bien que le vitrée constitue une barrière au passage des vecteurs viraux, il subsiste des interrogations quant au rôle que pourrait jouer la membrane limitante interne et la couche des fibres nerveuses sur la transduction. L'équipe de Luk Vandenberghe a présenté au congrès de l'ARVO (Poster No #771-C0060) une étude de transfert de

gènes par injection intravitréenne chez le primate. Le point clef de leur poster est, qu'après une vitrectomie par échange d'air, ils pèlent la membrane limitante interne. Le résultat est un transfert de gènes grandement amélioré en rétine centrale, zone habituellement difficile à transduire (Yin et al. 2011). Il serait donc très intéressant de tenter l'expérience dans le cadre de notre étude puisque cette zone de la rétine est celle où se trouve la plus grande densité de cellules ganglionnaires chez les modèles grands animaux (Dacey et al. 2005).

Ces deux points d'amélioration que sont le couplage des optogènes et l'optimisation de la vitrectomie sont, à mon sens, des améliorations pertinentes et facilement envisageables pour les futurs essais d'optogénétique chez les gros modèles animaux. En prenant un chemin un peu différent de celui du projet initial basé sur le transfert des optogènes Opn4, ChR2 et eNpHR, l'idée de poursuivre l'évaluation chez le chien *Rpe65^{-/-}* avec des optogènes de nouvelle génération apparaît aussi séduisante. Par optogène de nouvelle génération, j'entends des optogènes activables avec des quantités de lumière moins importantes, plus proches des conditions de vie habituelles, et avec des propriétés physico-chimiques proches des opsines naturelles des photorécepteurs (activable sur un spectre lumineux étendu, avec des temps de réponses et des périodes réfractaires courtes, induisant un photo courant de forte intensité). Plusieurs optogènes que nous avons déjà évoqués se rapprochent de ces critères et ont déjà fait la preuve de leur efficacité en transfert de gènes dans des modèles de DRH : L'optogène Catch dont le photo courant induit est deux fois plus important que celui de ChR2 (Kleinlogel et al. 2011) et permet de dépolariser fortement les cellules qui l'expriment (Cronin et al. 2014). L'avantage d'un photo courant important est de permettre d'obtenir un effet dépolarisant avec une quantité moindre d'optogènes exprimés (on pourrait avoir des réponses dans des cellules plus faiblement transduites). L'optogène LiGluR est aussi un choix intéressant puisqu'il pourrait induire une dépolarisation des cellules ganglionnaires à des intensités lumineuses 50 à 100 fois inférieures à celle de ChR2 ou Opn4 (Gaub et al. 2014). Ou encore l'évaluation des optogènes *Volvox*, notamment la version mVChR1 avec son pic d'absorption à 540nm et dont le transfert dans les cellules ganglionnaires restaure l'ERG et le PEV de rats RCS (Tomita et al. 2014). Même l'utilisation des opsines naturelles des photorécepteurs, et plus particulièrement la rhodopsine, s'avère être un choix intéressant pour la réactivation des cellules bipolaires (Cehajic-Kapetanovic et al. 2015, Gaub et al. 2015). De fait, la quantité de lumière requise pour l'activation de la rhodopsine est très faible, entre 100 et 1000 fois moins que pour l'activation de ChR2 ou d'Opn4. Mais l'utilisation de telles opsines présente des désavantages : 1) le temps de réponse de la rhodopsine dans les cellules bipolaires est étonnamment long (1s) et le temps de retour à un état de repos aussi (>1s). 2) la surexpression de rhodopsines étant toxique au niveau des photorécepteurs (Tan et al. 2001, Mao et al. 2011) des interrogations se posent quant à son expression dans les cellules bipolaires ou

ganglionnaires. 3) La rhodopsine est dépendante du cycle visuel pour le recyclage du all-trans retinol, la question se pose de savoir si les cellules de Müller vont permettre de remplir ce rôle efficacement. 4) le spectre d'absorption de la rhodopsine est proche de l'ultraviolet et n'est donc pas centré sur le spectre du visible.

Il y a encore beaucoup d'autres optogènes pertinents pour un transfert chez le gros animal, (Opto-mGluR6 ; DENAQ..). Cependant je pense qu'il y en a un qui actuellement surpasse les autres pour une application thérapeutique visant à restaurer une perception visuelle: l'optogène ChrimsonR. Il regroupe tous les avantages des optogènes cités précédemment (Klapoetke et al. 2014). Il a l'avantage de nécessiter des intensités lumineuses aussi faibles que celles utilisées dans les deux preuves basées sur la rhodopsine, soit $0,05\text{mW}\cdot\text{cm}^2$, l'équivalent de l'éclairage dans un bureau (Fig. 13A). De par sa fusion, ChrimsonR présente un double spectre d'absorption dans le bleu (issu de ChR2 et centré à 470nm) et dans le rouge (issu de Chrimson et centré à 590nm), balayant ainsi une grande partie du spectre visible (Fig. 13 B). L'intensité du photo courant induit par cet optogène dans le rouge est légèrement supérieure (674 pA vs 640 pA) au photo courant résultant de l'activation de l'optogène Catch, même si l'activation de ChrimsonR sur son second spectre dans le bleu (et médiée par ChR2) reste plus faible (217pA) (Kleinlogel et al. 2011, Klapoetke et al. 2014). Ainsi, cet optogène répond sur un spectre très large, à des intensités lumineuses physiologiques et il dépolarise fortement les cellules qui l'expriment grâce à son photo courant intense. Même si aucune publication ne prouve pour l'instant (il a été décrit récemment : Mars 2014) que son expression dans la rétine permet de restaurer des fonctions visuelles chez un modèle de DRH, une communication orale au congrès de l'ARVO cette année, *Sahel et al. No 5260*, atteste de son efficacité *in vivo*. Il a en effet été montré que l'expression de ChrimsonR, suite à une injection intravitreuse dans des rétines de souris rd1 ou de primates, conduit à une photosensibilité spécifique des cellules ganglionnaires, mise en évidence par puce MEA à 1 et 2 mois post-injection (pas d'information à des temps plus tardifs). Dans les deux analyses, et notamment pour les rétines de primates sains, des bloqueurs des canaux métabotropiques glutamatergiques (LAP-4, CNQX) ont été utilisés pour prouver que les variations de fréquence de potentiel d'action ne proviennent pas de réponses endogènes issues des photorécepteurs. Il a été précisé qu'aucun signe apparent de toxicité n'a été remarqué en fond d'œil et après analyse histologique chez ces deux modèles.

Je pense qu'on peut maintenant facilement comprendre pourquoi une étude du transfert de cet optogène dans les cellules ganglionnaires (ou bipolaires ON) de chiens *Rpe65^{-/-}* serait une perspective vraiment très intéressante. À noter que cette étude (et les brevets) de l'optogène ChrimsonR est portée par l'entreprise Gensight. Au vu des premiers résultats encourageants *in vivo*,

des propriétés de cet optogène, et des moyens financiers et scientifiques de cette compagnie, il est certain que nous allons beaucoup entendre parler de ChrimsonR.

Nous avons abordé le transfert d'optogènes sous l'angle d'une restauration des fonctions visuelles mais le transfert d'optogènes est un outil dont les applications s'étendent bien au-delà. De manière simpliste, un optogène peut être vu comme un moyen d'activer ou inhiber un neurone. Cet interrupteur biologique permet ainsi, par le biais de la lumière, de commander l'action de tout type de neurones qui l'expriment. Ensuite, il n'y a plus qu'à implanter une source lumineuse de longueur spécifique (par fibre optique) à proximité des cellules d'intérêt pour en prendre le contrôle à distance. Beaucoup d'équipes de recherche fondamentale l'ont compris depuis plus d'une dizaine d'année maintenant (Boyden et al. 2005) et utilisent l'optogénétique pour étudier les réseaux neuronaux, à l'aide de souris transgéniques exprimant un optogène sous contrôle d'un promoteur spécifique de la population cellulaire étudiée (Aravanis et al. 2007). Grâce à l'optogénétique, on peut aussi réguler l'expression de gènes dans des populations non neuronales, ce qui a été démontré avec l'utilisation de la mélanopsine dans des lymphocytes T (Ye et al. 2011). En effet, l'influx calcique consécutif à l'activation d'Opn4 induit naturellement, dans ces cellules, l'activation du facteur de transcription NFAT, qui va en conséquence se fixer à son promoteur spécifique. Or, si un transgène est placé derrière le promoteur sur lequel se fixe NFAT, alors l'expression de ce transgène est initiée. La production de cette protéine est donc sous contrôle des influx calciques d'Opn4, qui sont eux même contrôlés par les stimulations lumineuses délivrées par fibre optique.

Nous avons vu avec le transfert d'optogènes dans la rétine l'intérêt de l'optogénétique en recherche médicale, mais l'on pourrait citer beaucoup d'autres applications thérapeutiques liées à l'expression des optogènes ChR2 ou Opn4. Dans l'exemple précédent (Ye et al. 2011), les auteurs ont placé la séquence codante de l'insuline derrière le promoteur cible de NFAT. Ils avaient ainsi le moyen de réguler l'insulinémie des souris à distance (à l'aide d'une fibre optique sous cutanée). De cette manière, il est possible de réguler la sécrétion de n'importe quelle substance protéique dans le sang, ce qui offre beaucoup d'applications thérapeutiques puisque le transfert de gènes dans les cellules sanguines circulantes est particulièrement favorable. Autre exemple, que je trouve très intéressant, puisqu'on y retrouve les optogènes étudiés dans cette étude : l'expression des optogènes Opn4 ou ChR2 dans les neurones à orexines de l'hypothalamus, contrôlant les phases de veille et d'éveil, pourrait permettre de traiter des troubles du sommeil. En effet, des patients présentant une déficience dans la séquence codante du neurotransmetteur orexine ne peuvent plus induire la dépolarisation des neurones à orexines. Or la propagation de potentiel d'action par ces neurones (après dépolarisation) influence directement l'électro-encéphalogramme et donc la phase de sortie du sommeil. Ainsi, il a été montré que l'expression puis l'activation des optogènes Opn4 ou ChR2

permettent de contrôler à distance le réveil de souris saines (Adamantidis et al. 2007, Tsunematsu et al. 2013) . À l'inverse, l'expression puis l'activation de l'optogène hyperpolarisant eNpHR dans ces mêmes neurones permettent de faire entrer des souris saines en phase de sommeil, via la baisse de fréquence des potentiels d'action sous leur seuil basal (Tsunematsu et al. 2011).

Tous ces exemples me donnent le sentiment qu'au-delà de l'étude sur le modèle canin de DRH Rpe65^{-/-}, nous avons commencé à nous approprier, avec l'optogénétique, un outil que nous pourrions réutiliser pour d'autres projets de thérapie génique, tant ses applications sont larges et informatives. Je pense notamment à son utilité pour réguler l'expression de gènes, ainsi qu'à l'intérêt de l'optogénétique dans l'étude du fonctionnement des réseaux neuronaux. Je suis convaincu que l'optogénétique va bientôt devenir un outil incontournable de l'étude du fonctionnement des neurones.

- MATERIEL & METHODE -

Ce projet de thèse a suivi la politique d'assurance qualité du laboratoire, approuvée par le Lloyd's Register Quality Assurance comme respectant la norme ISO 9001:2008.

PRODUCTION DES VECTEURS RECOMBINANTS

Les cassettes d'expression des plasmides vecteurs utilisées pour la production des vecteurs AAV2/2 recombinants sont détaillées en figure 19. Il y figure également le titre de chaque production de vecteurs ayant tous été produits au Centre de Production de Vecteurs (CPV) de notre institut Atlantic Gene Therapy (AGT, Nantes, France). La concentration de chaque production de vecteurs a été déterminée par Dot Blot et PCR quantitative.

TRANSFECTION DES CELLULES HEK293

Le protocole débute par le dépôt de 5×10^5 cellules HEK293, dans chaque puits d'une plaque P6 (Falcon) 24 heures avant la transfection. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Sigma) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, SCF Eurobio) et 1% de pénicilline/streptavidine (PS, Sigma). Le milieu est changé 30 minutes avant la transfection avec un milieu DMEM 5% SVF 1% PS. On mélange 2 μ g d'ADN contenu dans 90 μ L d'eau, avec 10 μ L de CaCl₂. Puis sur vortex, on dépose goutte à goutte ce mélange dans une solution contenant 100 μ L d'HeBS. Les complexes calcium-ADN étant formés il ne reste plus qu'à déposer goutte à goutte les 200 μ L dans un puits d'une plaque P6 contenant les HEK293. Les cellules sont gardées 48h à 37°C dans un incubateur à CO₂. En plus de la transfection avec le plasmide d'intérêt, un plasmide contrôle pCMV.eGFP.BGHpA est utilisé. La visualisation à J+1 de la fluorescence émise par la protéine eGFP permettra de valider le bon déroulement du protocole de transfection. D'autre part, un contrôle négatif de transfection est réalisé en suivant le protocole de transfection mais en remplaçant l'ADN par de l'eau.

EXTRACTION ET PREPARATION DES ARN AVANT AMPLIFICATION PCR

Suite à l'euthanasie de l'animal le globe oculaire est énucléé, puis coupé en deux parties permettant l'élimination du vitré et de la choroïde. La rétine extraite est ensuite placée dans l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C. Pour les extractions sur cellules les kits d'extraction, traitement DNase et de rétro transcription sont les mêmes. Les expériences suivantes étant des manip très classiques, les protocoles ne sont pas détaillés. Le nom des kits étant fourni, il est laissé à la discrétion du lecteur de récupérer le protocole sur le site du fabricant.

L'extraction des ARN est effectuée avec la technique du TRIzol (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. Le TRIzol va permettre la lyse des cellules et la séparation des acides nucléiques courts du contenu cellulaire. Ce contenu nucléotidique est ensuite purifié à l'aide du kit Oligotex (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur à partir de 100ug d'ARN totaux. Les sondes OligodT qui composent ce kit vont permettre la purification des ARN messagers de par leurs queues PolyA, des ARN ribosomiaux et ARN de transfert non désirés. Ensuite, un double traitement à la DNase, avec le kit Ambion DNA-free (Invitrogen), est nécessaire pour éliminer toute trace d'ADN contaminant.

Les ARNm sont ensuite rétrotranscrits en ADN complémentaire à l'aide du kit Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis (Roche) toujours en suivant le protocole fourni. Un mélange d'hexanucléotides et de sondes oligodT est utilisé. La réaction est stoppée par chauffage des échantillons et donc désactivation de l'enzyme. Un traitement RNase est ajoutée pour éliminer tout ARN non rétrotranscrit. Enfin la concentration en ADNc est évaluée au spectromètre (Implen).

AMPLIFICATION PAR PCR

Les amplification PCR ont été réalisés à l'aide d'un kit KOD Hot Start (Millipore) dans les conditions décrites dans le tableau ci-après. Les couples de primer utilisés pour l'amplification des optogènes Opn4c, Opn4h et eNpHR sont les suivants (séquence 5'-3') :

Opn4h : (Sens) TTCTTCGGCTGGAGCGCCT (Anti-sens) ATCAGCCCCTTGGTCTTCCC

Opn4c : (Sens) GCTTTCGCTGGGTATTTCGCAC (Anti-sens) CAGCCCACCTCGCTCTCGG

eNpHR : (Sens) CTTATTGCTGTGTCAACCATC (Anti-sens) GGACACGACAGATTCGTTTGA

Produit	Concentration Finale	Déroulement
Tampon KOD (10X)	1X	
MgSO4 25 mM	1,5 mM	2 min à 95°C
dNTP 2 mM	0,2 mM	
KOD polymerase	0,75 U	40 cycles:
Amorce sens	0,4 µM	20 sec à 95°C
Amorce antisens	0,4 µM	10 sec à 62°C
ADNc	25 ng	30 sec à 70°C
Eau stérile	qsp 25 µL	

Condition d'utilisation de la KOD pour amplification par PCR des transcrits optogénétiques.

CLONAGE DU GENE OPN4 CANIN

La recherche d'une séquence codante pour le gène Opn4 canin nous a conduit à trouver deux séquences prédites sur deux bases de données couramment utilisées en biologie moléculaire. Ainsi la base de données américaine NCBI propose une séquence d'ADNc (XM_848642.2) et une séquence protéique associée (XP_853735.2). Alors que la base de donnée européenne Ensembl propose une autre séquence ADNc (NSCAFT00000025328) et protéique (NSCAFT00000023514) pour ce gène. Ces deux séquences diffèrent par le positionnement du dixième et dernier exon d'Opn4 sur le chromosome 4 du chien.

À la suite de l'extraction et du traitement à la DNase des ARNs le kit RLM-RACE-PCR (Ambion AM1700) est utilisé pour permettre d'amplifier des séquences ARN dont les extrémités sont de séquences inconnues. Le protocole est celui fourni par le fournisseur. Brièvement, les ARN sont déphosphorylés à l'aide d'une enzyme CiP (Calf intestinal phosphatase) pendant une heure à 37 degrés. L'élimination de des enzymes CiP se fait par précipitation phénol/chloroforme en présence d'ammonium acétate. Les ARN sont ensuite dissociés de leur coiffe par traitement TAP (Tobacco acid pyrophosphatase) pendant une heure à 37 degrés. Enfin les adaptateurs sont ligués de chaque côté à l'aide d'une T4 ARN ligase pendant une heure à 37 degrés. Le protocole d'amplification par PCR ou PCR nichée est le même que pour une PCR classique, comme décrit dans le paragraphe précédent.

IMMUNOCYTOCHIMIE SUR CELLULES HEK293 TRANSFECTEES

Des cellules HEK293 ont été cultivées sur des lamelles de verre préalablement disposées dans les puits d'une plaque P6. Suite à la transfection, les lamelles sont lavées au PBS1X puis fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10min. Les lamelles sont ensuite placées en chambre humide, rincées au PBS1X puis incubées 15 minutes avec une solution de perméabilisation (PBS1X, 0.2% Triton X-100

(Sigma)). Après rinçage au PBS1X, les lamelles sont saturées (PBS1X, 0,1% Tween20, 5% sérum de chèvre) pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite la solution est remplacée par la même solution mais contenant, cette fois, l'anticorps primaire produit chez le lapin (anti-OPN4 HPA039147 Sigma dilué au 1/20 ou anti-RPE65 généré par l'équipe et utilisé au 1/200e). Après 1 heure d'incubation, chaque lamelle est lavée 3 fois avec la solution de saturation, puis l'anticorps secondaire est ajouté (anti-lapin couplé Alexa546, invitrogen) au 1/250e dans la solution de saturation. Après trois lavages au PBS1X, les lamelles sont incubées avec une solution de DAPI (Sigma) diluée au 1/500e pendant 30 min qui permettra la visualisation des noyaux. Enfin, après trois nouveaux lavages les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage (Mowiol, Calbiochem) puis mises à sécher à 4°C sur la nuit avant observation au microscope à épifluorescence (Nikon, Eclipse 90i).

PROTOCOLE D UTILISATION DE LA SONDE CALCIQUE FURA2-AM

Les cellules HEK sont transfectées de manière analogue à la procédure décrite ci-dessus à la différence notable que le phosphate de calcium est remplacé par un transfectant JET-PEI (Olympus). Ce changement permet de ne pas perturber les flux calciques de la cellule avant l'analyse. Le plantage des cellules (5×10^5 cellules par puits) et la transfection ont lieu 48 heures avant l'analyse. Le milieu de culture est un milieu nutritif standard DMEM 10% SVF 1% Pénicilline/Streptavidine. Les cellules sont ensuite placées à l'incubateur, à l'obscurité, et la sonde calcique liposoluble, Fura-2AM (F1221, Thermo Fischer) est chargée 2h avant l'analyse, sous lumière rouge inactinique, à une concentration finale de 5 μ M pendant 30 min. Le milieu cellulaire est ensuite remplacé par un milieu HBSS dépourvu de calcium (Invitrogen), les cellules sont replacées à l'incubateur jusqu'au début de l'analyse.

Les enregistrements de "Time-lapse" se font à l'obscurité à l'aide d'un microscope plein champ Leica DMI 6000B. Les stimulations lumineuses sont réglées à une longueur d'onde de 470nm et pour une durée de 2 secondes, dans le but de stimuler l'optogène. En parallèle, pour le fonctionnement de la sonde calcique, une stimulation verte continue de faible intensité à 515 nm a lieu, avant et après stimulation de l'optogène.

L'analyse semi-automatisée des ratios de fluorescence s'est faite à l'aide du logiciel MetaFluor (Molecular Devices). Les ratios de fluorescence sont normalisés par la fluorescence basale de la cellule avant stimulation. L'analyse est réalisée sur la plateforme Picell de la structure fédérative de recherche (SFR) François Bonamie, de l'université de Nantes.

L'analyse semi-automatisée des ratio de fluorescence s'est faite à l'aide du logiciel MetaFluor (Molecular Devices). Les ratio de fluorescence sont normalisés par la fluorescence basale de la cellule avant stimulation. L'analyse est réalisée sur la plateforme Pcell de la structure fédérative de recherche (SFR) François Bonamie, de l'université de Nantes.

ANIMAUX

Seize rats Sprague Dowley (CD) ont été utilisés dans le projet (quatre pour chaque optogène). Ces rats ont été achetés auprès des laboratoires Charles River (Domaine des Oncins, France). Tous les chiens impliqués dans le projet sont listés dans le tableau 3. Y figurent également : l'âge des animaux au moment de l'injection, les vecteurs recombinants et les volumes injectés, ainsi que les observations liées à l'acte chirurgical et l'âge de l'animal au moment du sacrifice. Les chiens sains de race Beagle ont été achetés au centre d'élevage du domaine des Souches Mezilles (France). L'ensemble des animaux a été maintenu au centre de Boisbonne (ONIRIS, Ecole vétérinaire de Nantes, France). Le détail de chaque expérience menée sur chaque groupe d'animaux est présenté dans le tableau 2. Toutes les expériences impliquant des animaux ont été réalisées en accord avec l'engagement de l'Association de Recherche en Vision et Ophtalmology (ARVO) pour l'utilisation d'animaux en recherche sur la vision et l'ophtalmologie.

INJECTION INTRAVITREENNE DES VECTEURS RECOMBINANTS

Le chien est préalablement dilaté sur les 2 yeux par instillation d'Atropine collyre® 1%, puis de Mydriaticum® et Néosynéphrine de Faure® en alternance, 2h avant la chirurgie. Il est également prémédiqué au minimum 1h avant la chirurgie, par une injection sous-cutanée de Calmivet® à une dose de 0,25 mg/kg.

Pour la chirurgie, le chien est tout d'abord anesthésié par injection intraveineuse de Nesdonal® à une dose de 10mg/kg, et placé sous monitoring. Une anesthésie gazeuse prend le relais, avec un maintien de l'isoflurane entre 1 et 2%. L'animal est positionné en décubitus dorsal, puis on procède à une injection intramusculaire de Tolfédine® à une dose de 4 mg/kg pour limiter l'apparition de réseaux de fibrine dans la chambre antérieure lors de la chirurgie. Après instillation d'une à deux gouttes d'Oxybuprocaine® pour anesthésie locale, on désinfecte les yeux et les culs-de-sac conjonctivaux avec de la Vétédine® 5%, rincée à l'Ocryl®.

Le chirurgien fait ensuite une ouverture assez large de la conjonctive sur la partie supérieure de l'œil, par désinsertion de celle-ci. Il effectue une sclérotomie à 3 voies, puis réalise une vitrectomie axiale maximale avec hyaloïdectomie. Le vitrectomie est réalisée par un échange fluide/air permettant un meilleur contact du vecteur avec les cellules ganglionnaires. Le chirurgien injecte le vecteur à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 25G dans la chambre postérieure de l'œil en utilisant une des voies de sclérotomie comme point d'entrée. Un temps d'attente de 20min sans bouger l'animal est respecté afin d'optimiser le contact du vecteur avec les cellules ganglionnaires. Le chirurgien referme ensuite la conjonctive par suture grâce à du fil chirurgical Vicryl® 7/0, et une injection sous-conjonctivale de 0,5 mL de Dépo-Médrol® est réalisée pour minimiser les risques d'inflammation liés à la chirurgie.

Un traitement post-opératoire est mis en place, par nettoyage des yeux à l'Ocryl® solution (2 fois/jour), et instillation d'Atropine collyre® 1% (1 fois/jour), et Tiacil® (2 fois/jour) pendant 10 jours.

La nature des vecteurs injectés et leur volume sont précisés dans le tableau 3.

SUIVI PAR FOND D ŒIL

Un suivi funduscopique a été réalisé sur l'ensemble des animaux avant et après injection, à l'aide d'une caméra rétinienne Canon UVI connectée à un système de visualisation digitale (Lhedoph Win Software; Lheritier SA, Sain-Ouen-Laumône, France). Pour les rats, le suivi post-injection a été réalisé à 10 jours puis 1, 2 et 3 mois. Pour les chiens, les enregistrements ont eu lieu à 10 jours, 1, 2, 3 et mois après injection.

TOMOGRAPHIE À COHERENCE OPTIQUE EN DOMAINE SPECTRAL

Les enregistrements de tomographie à cohérence optique par domaine spectral (sd-OCT) ont été réalisés bilatéralement sur l'ensemble des chiens déficients injectés avec des optogènes, avant et à 1, 2, 3, et à plus de 8 mois post-injection. Les pupilles ont été dilatées par administration topique de : 0.3% d'atropine (Alcon Cusi SA, Espagne), tropicamide (Novartis, France) et phényléphrine hypochlorique (Novartis, France). Les chiens ont été anesthésiés par injection intraveineuse de thiopental sodium (Laboratoire Specia, France) suivie par une inhalation gazeuse d'isoflurane.

Les sd-OCT ont été réalisés avec un angle horizontal de 30° par rapport à la zone centrale supérieure scannée (Spectralis Heidelberg Engineering, Allemagne). Les enregistrements ont couvert une zone de 31 x 8 mm en rétine centrale supérieure. L'analyse des enregistrements a été traitée avec le

programme commercial fourni par le constructeur. L'épaisseur de la rétine est calculée de manière semi-automatique entre la membrane de bruch et la membrane limitante interne.

SUIVI PAR ELECTRORETINOGRAPHIE

Les fonctions rétiniennes des rats sains, des chiens sains et des chiens Rpe65^{-/-} ont été testées par ERG Ganzfeld bilatéral. Des enregistrements ERG ont été fait pour chaque animaux avant et à 1, 2, 3 mois post-injection. Pour les chiens les enregistrements ERG se sont poursuivi à 5 et à plus de 8 mois post-injection. Pour chaque animal, l'œil controlatéral a servi de contrôle interne non injecté (Exception faite des chiens Eroïne et Jerk présentant une cataracte leur l'œil controlatéral).

Les deux pupilles des animaux ont été dilatées par traitement topique comme décrit au-dessus (sd-OCT). Les chiens ont été adaptés pendant 20 minutes à l'obscurité puis anesthésiés par injection intraveineuse de thiopental sodium (Laboratoire Specia, France) suivi par une inhalation gazeuse d'isofluorane. Pour prévenir d'une déshydratation cornéenne durant l'enregistrement, une solution d'hydroxypropyl méthylcellulose (Laboratoires Théa, Clermont-Ferrand, France) a été appliqué sur chaque œil.

Les enregistrements ERG ont été faits avec un stimulateur Ganzfeld MonColor (Metrovision, Pénichies, France) et des électrodes placées sur des lentilles de contact cornéenne (ERG-jet; Microcomponents SA, Grenchen, Switzerland). L'examen ERG a suivi un protocole standardisé selon les recommandations de l'ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision), comme détaillé dans la publication *Lhériveau et al., 2010*.

Des procédures d'ERG supplémentaires ont également été entreprises : deux procédures en ambiances scotopiques sur fond orange avec soit des stimulations bleues 465 nm, soit des stimulations rouges 619 nm ($3 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$). Une procédure scotopique "Phnr", déjà décrite comme permettant d'évaluer la réponse des cellules ganglionnaires, et utilisée pour diagnostiquer les glaucomes, consistant en un flash rouge sur fond bleu en ambiance scotopique. Enfin, en plus d'utiliser la procédure scotopique mixte bâtonnet - cône ($3 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) du protocole standard, nous avons augmenté l'intensité des flashes pour atteindre $30 \text{ cd.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

PROCEDURE D IMPLANTATION DES ELECTRODES SOUS-DURALES

Les animaux font l'objet d'une prémédication par injection sous-cutanée de Calmivet. Durant l'opération les chiens sont maintenus sous anesthésie gazeuse par inhalation d'isofluorane (masque

puis sonde endotrachéale). Le neurochirurgien procède à une incision paramédiane réalisée en région fronto-pariétale droite. Une craniectomie de 2 cm de diamètre est alors réalisée en arrière de la suture coronale. Les pinces rongeurs de type Kerrison permettent d'affiner la craniectomie sans être traumatique pour la dure-mère ou le parenchyme sous-jacent. La dure-mère est ouverte. Le patch d'électrodes (FGO8A-SP10X-000, AD TECH, Racine USA) est inséré de manière caudale en sous dural au contact de la dure-mère pour éviter une neurotoxicité sur le parenchyme cérébral, jusqu'aux gyri marginal et endo marginal. Le patch d'électrodes est fixé à son émergence extra crânienne afin d'éviter tout déplacement.

Une radiographie est réalisée en per procédure afin de vérifier l'emplacement de l'électrode (Fig. 29 B). Le fil d'extension du patch d'électrodes est ensuite tunnelisé à travers la peau pour sortir en région frontale controlatérale, pour un enregistrement post chirurgical. Le fil d'extension est fixé à la peau. Il pourra ainsi être connecté à un appareil d'enregistrement électrophysiologique pour récupérer les signaux générés. Toutes les incisions ont été fermées avec du fil à peau 3/0.

PROCEDURE D ENREGISTREMENT DES SIGNAUX PEV

La pose des électrodes a lieu deux semaines avant le premier examen électrophysiologique. Un second examen électrophysiologique a lieu 4 semaines après implantation.

Lors du recueillement des signaux, les stimulations sont générées par le moniteur MonColor (Métrovision, Pérenchies FRANCE) en ambiance photopique. Les paramètres de la procédure de stimulation sont de 60 flashs de 3 cd.s.m^{-2} d'intensité, d'une durée de 5 ms chacun, espacés d'une période de 951 ms. Entre chaque cycle de stimulation, répété au minimum trois fois, un temps de repos de 5 min est observé. Le programme d'analyse utilisé est celui commercialisé avec le moniteur Moncolor. Les PEVs ont été réalisés en monoculaire mais également en binoculaire sous anesthésie (comme décrit pour les ERG).

TEST DE COMPORTEMENT CANIN

Le déroulé du test de comportement est décrit dans la figure 30 A. Le chien doit réussir à trouver la source lumineuse pour obtenir une récompense, en l'occurrence une caresse. La source lumineuse est placée aléatoirement dans l'un des deux couloirs, et doit être dans le champ visuel du chien depuis son point de départ. Ce test simple et rapide, est facile à reproduire un grand nombre de fois dans un laps de temps assez court (au-delà d'environ 45 min le chien fatigue et son attention baisse

sensiblement). Le chien est habitué à notre présence et au test durant deux séances (pas d'évaluation). Les tests enregistrés ne commencent qu'à partir de la troisième séance. Le résultat du test est facilement quantifiable et n'est pas ambigu. Les chiens aveugles ne pouvant réussir à associer la lumière à la réussite du test auront donc une chance sur deux (hasard) d'emprunter le bon couloir. Les chiens sains, ou chiens traités disposant d'une perception lumineuse, pourront associer la lumière à la réussite du test et donc à la récompense, ce qui devrait motiver leur envie de réussir. Nous comparerons l'œil injecté et l'œil non injecté distinctement à l'aide d'une lentille opaque. L'utilisation de lentilles opaques sur les deux yeux simultanément permet d'évaluer l'influence des facteurs autres que la lumière sur la réussite du test (biais).

Le test a été réalisé en ambiance scotopique avec une source lumineuse blanche de 480 lux. L'intensité lumineuse de cette ampoule étant ajustable, des intensités lumineuses plus faibles ont aussi été testées (intensité précise non communiquée par le fabricant), sans qu'on ne puisse voir une incidence sur la réussite du test par les animaux (données non montrées).

PREPARATION ET PROCEDURE D ANALYSE DES RETINES EVALUEES PAR MEA

La chambre postérieure est retirée et placée dans un milieu Ames tamponné avec de l'HEPES (Sigma Aldrich A1420) saturé en CO₂ et additionné de pénicilline et streptavidine. La rétine est transportée à 37°C sous oxygénation jusqu'au lieu d'analyse à Paris, Institut de la vision. Sur place, la rétine est isolée et mise à plat puis 4 zones sont prélevées. Chaque zone mesure environ 10 mm² et est située à égale distance entre la papille et la périphérie selon les quatre axes d'orientation habituels (Fig 34 A). Chaque morceau de rétine est ensuite placé sur une membrane de cellulose puis est pressé délicatement contre la puce MEA (MEA256 100/30 iR-ITO, Multichannel systems, Allemagne), avec les cellules ganglionnaires orientées vers les électrodes. La rétine est continuellement perfusée avec un milieu Ames, oxygéné et maintenu à 34°C, selon un débit de 1ml/min. Des agonistes des récepteurs métabotropiques au glutamate L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid (LAP-4, Tocris Bioscience, cat No. 0103) ainsi que des bloqueurs antagonistes CNQX (Tocris Bioscience, cat No. 1045) et CPP (Tocris Bioscience, cat No. 0247) sont fraîchement dilués à 50 µM dans le système de perfusion 30 minutes avec les enregistrements (enregistrements distincts des analyses en milieu Ames seul). Les stimulations lumineuses sont produites par un polychromateur (Polychrome V monochromator, Olympus) couplé à un générateur STG2008 (MCS). Les stimulations sont calibrées à 1.10^{17} photons/cm²/s et à des longueurs d'onde de 480nm et 680nm pendant 10 secondes, avec trois minutes d'intervalle entre chaque flash.

Les activités extracellulaires brutes des cellules ganglionnaires rétiniennes sont amplifiées et échantillonnées à 20kHz. Ces résultats sont ensuite filtrés par un filtre passe haut à 200Hz avant analyse à l'aide du logiciel Spike2 v.7 (CED Co, UK) et d'un script fait à façon sur le logiciel Matlab v.R2014b (MathWorks, Natick, MA, USA). L'activité moyenne d'une cellule et sa déviation standard sont calculées avant stimulus. Ne sont considérées comme une réponse que les activités moyennes excédant de plus de 4 fois la déviation standard dans les 2 secondes après le début ou la fin de la stimulation.

À noter que La puce MEA utilisée se compose de 256 électrodes réparties sur une surface de 2 mm². L'analyse se déroule sur trois jours, au-delà le nombre de cellules ganglionnaires émettant des réponses basales diminue sensiblement. Ainsi en tenant compte de la surface de la puce et de la durée de l'expérience, il est possible d'analyser durant ces 3 jours environ 4 zones de 10 mm² sur chacune des deux rétines d'un chien. La puce est déplacée de proche en proche de manière à scanner l'ensemble du fragment. Cela permet d'enregistrer les potentiels d'action de plusieurs centaines de cellules ganglionnaires sur un fragment de 10 mm².

MONTAGE À PLAT ET MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

La procédure détaillée est décrite dans l'article suivant (Duisit et al., 2002). Brièvement, l'œil énucléé est fixé pendant 2 heures en PFA 4% (dilué en PBS). La chambre antérieure et le cristallin sont retirés pour ne conserver que la chambre postérieure. Les corps ciliaires et, éventuellement, le corps vitréen sont enlevés pour permettre de dissocier la neurorétine de la sclère et de l'épithélium pigmentaire. Quatre incisions permettent de mettre à plat la neurorétine.

La rétine est ensuite directement marquée. Le protocole de marquage immunohistochimique ainsi que la procédure d'acquisition des images par microscopie confocale sont décrits en détail dans notre publication, *Tshilenge et al.*, présente dans ce manuscrit de thèse. À noter que les deux anticorps que nous avons utilisés sont dilués au 1/500ème, le premier est dirigé contre la protéine ChR2 (Progen, réf 651180) et le second est dirigé contre la protéine Opn4h (Protéogenix, MC-19). La fluorescence des animaux injectés avec des constructions eGFP est native et n'est pas amplifiée par anticorps.

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

Adamantidis, A. R., F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth and L. de Lecea (2007). "Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons." Nature **450**(7168): 420-424.

Aguirre, G. D., V. Baldwin, S. Pearce-Kelling, K. Narfstrom, K. Ray and G. M. Acland (1998). "Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect." Mol Vis **4**: 23.

Ameri, H., T. Ratanapakorn, S. Ufer, H. Eckhardt, M. S. Humayun and J. D. Weiland (2009). "Toward a wide-field retinal prosthesis." J Neural Eng **6**(3): 035002.

Annear, M. J., F. M. Mowat, J. T. Bartoe, J. Querubin, S. A. Azam, M. Basche, P. G. Curran, A. J. Smith, J. W. Bainbridge, R. R. Ali and S. M. Petersen-Jones (2013). "Successful gene therapy in older Rpe65-deficient dogs following subretinal injection of an adeno-associated vector expressing RPE65." Hum Gene Ther **24**(10): 883-893.

Aravanis, A. M., L. P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider and K. Deisseroth (2007). "An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology." J Neural Eng **4**(3): S143-156.

Atchison, R. W., B. C. Casto and W. M. Hammon (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." Science **149**(3685): 754-756.

Bainbridge, J. W., M. S. Mehat, V. Sundaram, S. J. Robbie, S. E. Barker, C. Ripamonti, A. Georgiadis, F. M. Mowat, S. G. Beattie, P. J. Gardner, K. L. Feathers, V. A. Luong, S. Yzer, K. Balaggan, A. Viswanathan, T. J. de Ravel, I. Casteels, G. E. Holder, N. Tyler, F. W. Fitzke, R. G. Weleber, M. Nardini, A. T. Moore, D. A. Thompson, S. M. Petersen-Jones, M. Michaelides, L. I. van den Born, A. Stockman, A. J. Smith, G. Rubin and R. R. Ali (2015). "Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis." N Engl J Med **372**(20): 1887-1897.

Bainbridge, J. W., A. J. Smith, S. S. Barker, S. Robbie, R. Henderson, K. Balaggan, A. Viswanathan, G. E. Holder, A. Stockman, N. Tyler, S. Petersen-Jones, S. S. Bhattacharya, A. J. Thrasher, F. W. Fitzke, B. J. Carter, G. S. Rubin, A. T. Moore and R. R. Ali (2008). "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis." N Engl J Med **358**(21): 2231-2239.

Bakondi, B., W. Lv, B. Lu, M. K. Jones, Y. Tsai, K. J. Kim, R. Levy, A. A. Akhtar, J. J. Breunig, C. N. Svendsen and S. Wang (2016). "In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." Mol Ther **24**(3): 556-563.

Beltran, W. A., A. V. Cideciyan, K. E. Guziewicz, S. Iwabe, M. Swider, E. M. Scott, S. V. Savina, G. Ruthel, F. Stefano, L. Zhang, R. Zorger, A. Sumaroka, S. G. Jacobson and G. D. Aguirre (2014). "Canine retina has a primate fovea-like bouquet of cone photoreceptors which is affected by inherited macular degenerations." PLoS One **9**(3): e90390.

Beltran, W. A., A. V. Cideciyan, A. S. Lewin, S. Iwabe, H. Khanna, A. Sumaroka, V. A. Chiodo, D. S. Fajardo, A. J. Roman, W. T. Deng, M. Swider, T. S. Aleman, S. L. Boye, S. Genini, A. Swaroop, W. W. Hauswirth, S. G. Jacobson and G. D. Aguirre (2012). "Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(6): 2132-2137.

Bennett, J., J. Wellman, K. A. Marshall, S. McCague, M. Ashtari, J. DiStefano-Pappas, O. U. Elci, D. C. Chung, J. Sun, J. F. Wright, D. R. Cross, P. Aravand, L. L. Cyckowski, J. L. Bennicelli, F. Mingozi, A. Auricchio, E. A. Pierce, J. Ruggiero, B. P. Leroy, F. Simonelli, K. A. High and A. M. Maguire (2016). "Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial." Lancet.

Bi, A., J. Cui, Y. P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dizhoor and Z. H. Pan (2006). "Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration." Neuron **50**(1): 23-33.

Boyd, R. F., S. L. Boye, T. J. Conlon, K. E. Erger, D. G. Sledge, I. M. Langohr, W. W. Hauswirth, A. M. Komaromy, S. E. Boye, S. M. Petersen-Jones and J. T. Bartoe (2016). "Reduced retinal transduction and enhanced transgene-directed immunogenicity with intravitreal delivery of rAAV following posterior vitrectomy in dogs." Gene Ther **23**(6): 548-556.

Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-1268.

Boye, S. E., S. L. Boye, J. Pang, R. Ryals, D. Everhart, Y. Umino, A. W. Neeley, J. Besharse, R. Barlow and W. W. Hauswirth (2010). "Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse." PLoS One **5**(6): e11306.

Busskamp, V., J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siegert, A. C. Groner, E. Cabuy, V. Forster, M. Seeliger, M. Biel, P. Humphries, M. Paques, S. Mohand-Said, D. Trono, K. Deisseroth, J. A. Sahel, S. Picaud and B. Roska (2010). "Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa." Science **329**(5990): 413-417.

Byrne, L. C., D. Dalkara, G. Luna, S. K. Fisher, E. Clerin, J. A. Sahel, T. Leveillard and J. G. Flannery (2015). "Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration." J Clin Invest **125**(1): 105-116.

Cai, C., Q. Ren, N. J. Desai, J. F. Rizzo, 3rd and S. I. Fried (2011). "Response variability to high rates of electric stimulation in retinal ganglion cells." J Neurophysiol **106**(1): 153-162.

- Calcedo, R., L. H. Vandenberghe, G. Gao, J. Lin and J. M. Wilson (2009). "Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses." J Infect Dis **199**(3): 381-390.
- Caporale, N., K. D. Kolstad, T. Lee, I. Tochitsky, D. Dalkara, D. Trauner, R. Kramer, Y. Dan, E. Y. Isacoff and J. G. Flannery (2011). "LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness." Mol Ther **19**(7): 1212-1219.
- Carter-Dawson, L. D. and M. M. LaVail (1979). "Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy." J Comp Neurol **188**(2): 245-262.
- Cehajic-Kapetanovic, J., C. Eleftheriou, A. E. Allen, N. Milosavljevic, A. Pienaar, R. Bedford, K. E. Davis, P. N. Bishop and R. J. Lucas (2015). "Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin." Curr Biol **25**(16): 2111-2122.
- Cehajic-Kapetanovic, J., M. M. Le Goff, A. Allen, R. J. Lucas and P. N. Bishop (2011). "Glycosidic enzymes enhance retinal transduction following intravitreal delivery of AAV2." Mol Vis **17**: 1771-1783.
- Cideciyan, A. V., G. K. Aguirre, S. G. Jacobson, O. H. Butt, S. B. Schwartz, M. Swider, A. J. Roman, S. Sadigh and W. W. Hauswirth (2015). "Pseudo-fovea formation after gene therapy for RPE65-LCA." Invest Ophthalmol Vis Sci **56**(1): 526-537.
- Cideciyan, A. V., W. W. Hauswirth, T. S. Aleman, S. Kaushal, S. B. Schwartz, S. L. Boye, E. A. Windsor, T. J. Conlon, A. Sumaroka, A. J. Roman, B. J. Byrne and S. G. Jacobson (2009). "Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis." N Engl J Med **361**(7): 725-727.
- Cideciyan, A. V., M. Swider, T. S. Aleman, W. J. Feuer, S. B. Schwartz, R. C. Russell, J. D. Steinberg, E. M. Stone and S. G. Jacobson (2012). "Macular function in macular degenerations: repeatability of microperimetry as a potential outcome measure for ABCA4-associated retinopathy trials." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(2): 841-852.
- Colella, P., A. Sommella, E. Marrocco, U. Di Vicino, E. Polishchuk, M. Garcia Garrido, M. W. Seeliger, R. Polishchuk and A. Auricchio (2013). "Myosin7a deficiency results in reduced retinal activity which is improved by gene therapy." PLoS One **8**(8): e72027.
- Colella, P., I. Trapani, G. Cesi, A. Sommella, A. Manfredi, A. Puppo, C. Iodice, S. Rossi, F. Simonelli, M. Giunti, M. L. Bacci and A. Auricchio (2014). "Efficient gene delivery to the cone-enriched pig retina by dual AAV vectors." Gene Ther **21**(4): 450-456.
- Corrochano, S., R. Barhoum, P. Boya, A. I. Arroba, N. Rodriguez-Muela, V. Gomez-Vicente, F. Bosch, F. de Pablo, P. de la Villa and E. J. de la Rosa (2008). "Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(9): 4188-4194.

Cronin, T., L. H. Vandenberghe, P. Hantz, J. Juttner, A. Reimann, A. E. Kacso, R. M. Huckfeldt, V. Busskamp, H. Kohler, P. S. Lagali, B. Roska and J. Bennett (2014). "Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter." EMBO Mol Med **6**(9): 1175-1190.

Dacey, D. M., H. W. Liao, B. B. Peterson, F. R. Robinson, V. C. Smith, J. Pokorny, K. W. Yau and P. D. Gamlin (2005). "Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN." Nature **433**(7027): 749-754.

Dalkara, D., L. C. Byrne, R. R. Klimczak, M. Visel, L. Yin, W. H. Merigan, J. G. Flannery and D. V. Schaffer (2013). "In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous." Sci Transl Med **5**(189): 189ra176.

Dalkara, D., K. D. Kolstad, N. Caporale, M. Visel, R. R. Klimczak, D. V. Schaffer and J. G. Flannery (2009). "Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous." Mol Ther **17**(12): 2096-2102.

Dalkara, D., K. D. Kolstad, K. I. Guerin, N. V. Hoffmann, M. Visel, R. R. Klimczak, D. V. Schaffer and J. G. Flannery (2011). "AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa." Mol Ther **19**(9): 1602-1608.

Doroudchi, M. M., K. P. Greenberg, J. Liu, K. A. Silka, E. S. Boyden, J. A. Lockridge, A. C. Arman, R. Janani, S. E. Boye, S. L. Boye, G. M. Gordon, B. C. Matteo, A. P. Sampath, W. W. Hauswirth and A. Horsager (2011). "Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness." Mol Ther **19**(7): 1220-1229.

Dudus, L., V. Anand, G. M. Acland, S. J. Chen, J. M. Wilson, K. J. Fisher, A. M. Maguire and J. Bennett (1999). "Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV." Vision Res **39**(15): 2545-2553.

Edwards, S. L., N. K. Charlie, M. C. Milfort, B. S. Brown, C. N. Gravlín, J. E. Knecht and K. G. Miller (2008). "A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Biol **6**(8): e198.

Elachouri, G., I. Lee-Rivera, E. Clerin, M. Argentini, R. Fridlich, F. Blond, V. Ferracane, Y. Yang, W. Raffelsberger, J. Wan, J. Bennett, J. A. Sahel, D. J. Zack and T. Leveillard (2015). "Thioredoxin rod-derived cone viability factor protects against photooxidative retinal damage." Free Radic Biol Med **81**: 22-29.

Fernandez-Sanchez, L., P. Lax, C. Isiegas, E. Ayuso, J. M. Ruiz, P. de la Villa, F. Bosch, E. J. de la Rosa and N. Cuenca (2012). "Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa." Hum Gene Ther **23**(12): 1290-1300.

Folliot, S., D. Briot, H. Conrath, N. Provost, Y. Cherel, P. Moullier and F. Rolling (2003). "Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector." J Gene Med **5**(6): 493-501.

Gaub, B. M., M. H. Berry, A. E. Holt, E. Y. Isacoff and J. G. Flannery (2015). "Optogenetic Vision Restoration Using Rhodopsin for Enhanced Sensitivity." Mol Ther **23**(10): 1562-1571.

Gaub, B. M., M. H. Berry, A. E. Holt, A. Reiner, M. A. Kienzler, N. Dolgova, S. Nikonov, G. D. Aguirre, W. A. Beltran, J. G. Flannery and E. Y. Isacoff (2014). "Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(51): E5574-5583.

Giesbers, M. E., N. Shirzad-Wasei, G. J. Bosman and W. J. de Grip (2008). "Functional expression, targeting and Ca²⁺ signaling of a mouse melanopsin-eYFP fusion protein in a retinal pigment epithelium cell line." Photochem Photobiol **84**(4): 990-995.

Gomez-Ulla, F., M. F. Bande and M. Abalde (2015). "Acute loss of vision after an intravitreal injection of ocriplasmin: a functional evolutionary study for 1-year follow-up." Doc Ophthalmol **131**(3): 231-235.

Greenberg, K. P., A. Pham and F. S. Werblin (2011). "Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism." Neuron **69**(4): 713-720.

Hellstrom, M., M. J. Ruitenberg, M. A. Pollett, E. M. Ehlert, J. Twisk, J. Verhaagen and A. R. Harvey (2009). "Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection." Gene Ther **16**(4): 521-532.

Hernandez, M., S. E. Pearce-Kelling, F. D. Rodriguez, G. D. Aguirre and E. Vecino (2010). "Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of Leber congenital amaurosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(12): 6793-6802.

Husson, S. J., A. Gottschalk and A. M. Leifer (2013). "Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: from synapse to circuits and behaviour." Biol Cell **105**(6): 235-250.

Igarashi, T., K. Miyake, N. Asakawa, N. Miyake, T. Shimada and H. Takahashi (2013). "Direct comparison of administration routes for AAV8-mediated ocular gene therapy." Curr Eye Res **38**(5): 569-577.

Isago, H., E. Sugano, Z. Wang, N. Murayama, E. Koyanagi, M. Tamai and H. Tomita (2012). "Age-dependent differences in recovered visual responses in Royal College of Surgeons rats transduced with the Channelrhodopsin-2 gene." J Mol Neurosci **46**(2): 393-400.

Ivanova, E., G. S. Hwang, Z. H. Pan and D. Troilo (2010). "Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(10): 5288-5296.

Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, R. Ratnakaram, E. Heon, S. B. Schwartz, A. J. Roman, M. C. Peden, T. S. Aleman, S. L. Boye, A. Sumaroka, T. J. Conlon, R. Calcedo, J. J. Pang, K. E. Erger, M. B. Olivares, C. L.

Mullins, M. Swider, S. Kaushal, W. J. Feuer, A. Iannaccone, G. A. Fishman, E. M. Stone, B. J. Byrne and W. W. Hauswirth (2012). "Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years." Arch Ophthalmol **130**(1): 9-24.

Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, A. J. Roman, A. Sumaroka, S. B. Schwartz, E. Heon and W. W. Hauswirth (2015). "Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness." N Engl J Med **372**(20): 1920-1926.

Jeon, C. J., E. Strettoi and R. H. Masland (1998). "The major cell populations of the mouse retina." J Neurosci **18**(21): 8936-8946.

Kevany, B. M. and K. Palczewski (2010). "Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors." Physiology (Bethesda) **25**(1): 8-15.

Khabou, H. and D. Dalkara (2015). "[Developments in gene delivery vectors for ocular gene therapy]." Med Sci (Paris) **31**(5): 529-537.

Klapoetke, N. C., Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K. Wong and E. S. Boyden (2014). "Independent optical excitation of distinct neural populations." Nat Methods **11**(3): 338-346.

Klein, D., A. Mendes-Madeira, P. Schlegel, F. Rolling, B. Lorenz, S. Haverkamp and K. Stieger (2014). "Immuno-histochemical analysis of rod and cone reaction to RPE65 deficiency in the inferior and superior canine retina." PLoS One **9**(1): e86304.

Kleinlogel, S., K. Feldbauer, R. E. Dempski, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann and E. Bamberg (2011). "Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable channelrhodopsin CatCh." Nat Neurosci **14**(4): 513-518.

Koirala, A., R. S. Makkia, S. M. Conley, M. J. Cooper and M. I. Naash (2013). "S/MAR-containing DNA nanoparticles promote persistent RPE gene expression and improvement in RPE65-associated LCA." Hum Mol Genet **22**(8): 1632-1642.

Kolstad, K. D., D. Dalkara, K. Guerin, M. Visel, N. Hoffmann, D. V. Schaffer and J. G. Flannery (2010). "Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration." Hum Gene Ther **21**(5): 571-578.

Komaromy, A. M., J. J. Alexander, J. S. Rowlan, M. M. Garcia, V. A. Chiodo, A. Kaya, J. C. Tanaka, G. M. Acland, W. W. Hauswirth and G. D. Aguirre (2010). "Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia." Hum Mol Genet **19**(13): 2581-2593.

Komaromy, A. M., J. S. Rowlan, A. T. Corr, S. L. Reinstein, S. L. Boye, A. E. Cooper, A. Gonzalez, B. Levy, R. Wen, W. W. Hauswirth, W. A. Beltran and G. D. Aguirre (2013). "Transient photoreceptor

deconstruction by CNTF enhances rAAV-mediated cone functional rescue in late stage CNGB3-achromatopsia." Mol Ther **21**(6): 1131-1141.

Kumbalasiri, T., M. D. Rollag, M. C. Isoldi, A. M. Castrucci and I. Provencio (2007). "Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light." Photochem Photobiol **83**(2): 273-279.

Lagali, P. S., D. Balya, G. B. Awatramani, T. A. Munch, D. S. Kim, V. Busskamp, C. L. Cepko and B. Roska (2008). "Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration." Nat Neurosci **11**(6): 667-675.

Le Meur, G., K. Stieger, A. J. Smith, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, N. Provost, Y. Pereon, Y. Cherel, R. R. Ali, C. Hamel, P. Moullier and F. Rolling (2007). "Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium." Gene Ther **14**(4): 292-303.

Lheriteau, E., L. Libeau, A. Mendes-Madeira, J. Y. Deschamps, M. Weber, G. Le Meur, N. Provost, C. Guihal, P. Moullier and F. Rolling (2010). "Regulation of retinal function but nonrescue of vision in RPE65-deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors." Mol Ther **18**(6): 1085-1093.

Lheriteau, E., L. Libeau, K. Stieger, J. Y. Deschamps, A. Mendes-Madeira, N. Provost, F. Lemoine, C. Mellersh, N. M. Ellinwood, Y. Cherel, P. Moullier and F. Rolling (2009). "The RPGRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy." Mol Vis **15**: 349-361.

Lheriteau, E., L. Petit, M. Weber, G. Le Meur, J. Y. Deschamps, L. Libeau, A. Mendes-Madeira, C. Guihal, A. Francois, R. Guyon, N. Provost, F. Lemoine, S. Papal, A. El-Amraoui, M. A. Colle, P. Moullier and F. Rolling (2014). "Successful gene therapy in the RPGRIP1-deficient dog: a large model of cone-rod dystrophy." Mol Ther **22**(2): 265-277.

Lin, B., A. Koizumi, N. Tanaka, S. Panda and R. H. Masland (2008). "Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(41): 16009-16014.

Liu, M. M., J. M. Dai, W. Y. Liu, C. J. Zhao, B. Lin and Z. Q. Yin (2016). "Human melanopsin-AAV2/8 transfection to retina transiently restores visual function in rd1 mice." Int J Ophthalmol **9**(5): 655-661.

Lopes, V. S., S. E. Boye, C. M. Louie, S. Boye, F. Dyka, V. Chiodo, H. Fofu, W. W. Hauswirth and D. S. Williams (2013). "Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus." Gene Ther **20**(8): 824-833.

Lu, Q., T. H. Ganjawala, E. Ivanova, J. G. Cheng, D. Troilo and Z. H. Pan (2016). "AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates." Gene Ther.

Mace, E., R. Caplette, O. Marre, A. Sengupta, A. Chaffiol, P. Barbe, M. Desrosiers, E. Bamberg, J. A. Sahel, S. Picaud, J. Duebel and D. Dalkara (2015). "Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice." Mol Ther **23**(1): 7-16.

Maguire, A. M., K. A. High, A. Auricchio, J. F. Wright, E. A. Pierce, F. Testa, F. Mingozzi, J. L. Benniselli, G. S. Ying, S. Rossi, A. Fulton, K. A. Marshall, S. Banfi, D. C. Chung, J. I. Morgan, B. Hauck, O. Zelenaia, X. Zhu, L. Raffini, F. Coppieters, E. De Baere, K. S. Shindler, N. J. Volpe, E. M. Surace, C. Acerra, A. Lyubarsky, T. M. Redmond, E. Stone, J. Sun, J. W. McDonnell, B. P. Leroy, F. Simonelli and J. Bennett (2009). "Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial." Lancet **374**(9701): 1597-1605.

Majji, A. B., M. S. Humayun, J. D. Weiland, S. Suzuki, S. A. D'Anna and E. de Juan, Jr. (1999). "Long-term histological and electrophysiological results of an inactive epiretinal electrode array implantation in dogs." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(9): 2073-2081.

Manfredi, A., E. Marrocco, A. Puppo, G. Cesi, A. Sommella, M. Della Corte, S. Rossi, M. Giunti, C. M. Craft, M. L. Bacci, F. Simonelli, E. M. Surace and A. Auricchio (2013). "Combined rod and cone transduction by adeno-associated virus 2/8." Hum Gene Ther **24**(12): 982-992.

Mao, H., M. S. Gorbatyuk, B. Rossmiller, W. W. Hauswirth and A. S. Lewin (2012). "Long-term rescue of retinal structure and function by rhodopsin RNA replacement with a single adeno-associated viral vector in P23H RHO transgenic mice." Hum Gene Ther **23**(4): 356-366.

Mao, H., T. James, Jr., A. Schwein, A. E. Shabashvili, W. W. Hauswirth, M. S. Gorbatyuk and A. S. Lewin (2011). "AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." Hum Gene Ther **22**(5): 567-575.

Marc, R. E., B. W. Jones, C. B. Watt and E. Strettoi (2003). "Neural remodeling in retinal degeneration." Prog Retin Eye Res **22**(5): 607-655.

Margalit, E., J. D. Weiland, R. E. Clatterbuck, G. Y. Fujii, M. Maia, M. Tameesh, G. Torres, S. A. D'Anna, S. Desai, D. V. Piyathaisere, A. Olivi, E. de Juan, Jr. and M. S. Humayun (2003). "Visual and electrical evoked response recorded from subdural electrodes implanted above the visual cortex in normal dogs under two methods of anesthesia." J Neurosci Methods **123**(2): 129-137.

Matsumoto, B., J. C. Blanks and S. J. Ryan (1984). "Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane." Invest Ophthalmol Vis Sci **25**(1): 71-82.

Matsuyama, T., T. Yamashita, Y. Imamoto and Y. Shichida (2012). "Photochemical properties of mammalian melanopsin." Biochemistry **51**(27): 5454-5462.

Melillo, P., L. Pecchia, F. Testa, S. Rossi, J. Bennett and F. Simonelli (2012). "Pupillometric analysis for assessment of gene therapy in Leber Congenital Amaurosis patients." Biomed Eng Online **11**: 40.

Miller, P. E. and C. J. Murphy (1995). "Vision in dogs." J Am Vet Med Assoc **207**(12): 1623-1634.

Moskalenko, M., L. Chen, M. van Roey, B. A. Donahue, R. O. Snyder, J. G. McArthur and S. D. Patel (2000). "Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure." J Virol **74**(4): 1761-1766.

Mowat, F. M., A. R. Breuwer, J. T. Bartoe, M. J. Annear, Z. Zhang, A. J. Smith, J. W. Bainbridge, S. M. Petersen-Jones and R. R. Ali (2013). "RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs." Gene Ther **20**(5): 545-555.

Mowat, F. M., K. R. Gornik, A. Dinculescu, S. L. Boye, W. W. Hauswirth, S. M. Petersen-Jones and J. T. Bartoe (2014). "Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach." Gene Ther **21**(1): 96-105.

Muniz, A., B. S. Betts, A. R. Trevino, K. Buddavarapu, R. Roman, J. X. Ma and A. T. Tsin (2009). "Evidence for two retinoid cycles in the cone-dominated chicken eye." Biochemistry **48**(29): 6854-6863.

Narfstrom, K., A. Wrigstad and S. E. Nilsson (1989). "The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness." Br J Ophthalmol **73**(9): 750-756.

Nishiguchi, K. M., L. S. Carvalho, M. Rizzi, K. Powell, S. M. Holthaus, S. A. Azam, Y. Duran, J. Ribeiro, U. F. Luhmann, J. W. Bainbridge, A. J. Smith and R. R. Ali (2015). "Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179." Nat Commun **6**: 6006.

Pang, J. J., S. L. Boye, A. Kumar, A. Dinculescu, W. Deng, J. Li, Q. Li, A. Rani, T. C. Foster, B. Chang, N. L. Hawes, J. H. Boatright and W. W. Hauswirth (2008). "AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(10): 4278-4283.

Pang, J. J., B. Chang, A. Kumar, S. Nusinowitz, S. M. Noorwez, J. Li, A. Rani, T. C. Foster, V. A. Chiodo, T. Doyle, H. Li, R. Malhotra, J. Tusner, J. H. McDowell, S. H. Min, Q. Li, S. Kaushal and W. W. Hauswirth (2005). "Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis." Mol Ther **10**: 10.

Petersen-Jones, S. M. and A. M. Komaromy (2015). "Dog models for blinding inherited retinal dystrophies." Hum Gene Ther Clin Dev **26**(1): 15-26.

Petit, L., E. Lheriteau, M. Weber, G. Le Meur, J. Y. Deschamps, N. Provost, A. Mendes-Madeira, L. Libeau, C. Guihal, M. A. Colle, P. Moullier and F. Rolling (2012). "Restoration of vision in the pde6beta-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy." Mol Ther **20**(11): 2019-2030.

Petr-Silva, H., A. Dinculescu, Q. Li, S. H. Min, V. Chiodo, J. J. Pang, L. Zhong, S. Zolotukhin, A. Srivastava, A. S. Lewin and W. W. Hauswirth (2009). "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors." Mol Ther **17**(3): 463-471.

Pichard, V., N. Provost, A. Mendes-Madeira, L. Libeau, P. Hulin, K. T. Tshilenge, M. Biget, B. Ameline, J. Y. Deschamps, M. Weber, G. Le Meur, M. A. Colle, P. Moullier and F. Rolling (2016). "AAV-mediated Gene Therapy Halts Retinal Degeneration in PDE6beta-deficient Dogs." Mol Ther **24**(5): 867-876.

Pickard, G. E., S. B. Baver, M. D. Ogilvie and P. J. Sollars (2009). "Light-induced fos expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in melanopsin knockout (opn4) mice." PLoS One **4**(3): e4984.

Provencio, I., I. R. Rodriguez, G. Jiang, W. P. Hayes, E. F. Moreira and M. D. Rollag (2000). "A novel human opsin in the inner retina." J Neurosci **20**(2): 600-605.

Provost, N., G. Le Meur, M. Weber, A. Mendes-Madeira, G. Podevin, Y. Cherel, M. A. Colle, J. Y. Deschamps, P. Moullier and F. Rolling (2005). "Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain." Mol Ther **11**(2): 275-283.

Ramachandran, P. S., S. Bhattarai, P. Singh, R. L. Boudreau, S. Thompson, A. R. Laspada, A. V. Drack and B. L. Davidson (2014). "RNA interference-based therapy for spinocerebellar ataxia type 7 retinal degeneration." PLoS One **9**(4): e95362.

Ramachandran, P. S., J. Y. Song and J. Bennett (2015). "Exploiting metabolic and antioxidant pathways to maintain vision in blinding disease." J Clin Invest **125**(4): 1390-1392.

Saade, C. J., K. Alvarez-Delfin and J. M. Fadool (2013). "Rod photoreceptors protect from cone degeneration-induced retinal remodeling and restore visual responses in zebrafish." J Neurosci **33**(5): 1804-1814.

Sahel, J. A. and B. Roska (2013). "Gene therapy for blindness." Annu Rev Neurosci **36**: 467-488.

Scalabrino, M. L., S. L. Boye, K. M. Fransen, J. M. Noel, F. M. Dyka, S. H. Min, Q. Ruan, C. N. De Leeuw, E. M. Simpson, R. G. Gregg, M. A. McCall, N. S. Peachey and S. E. Boye (2015). "Intravitreal delivery of a novel AAV vector targets ON bipolar cells and restores visual function in a mouse model of complete congenital stationary night blindness." Hum Mol Genet **24**(21): 6229-6239.

Schild, L. C. and D. A. Glauser (2015). "Dual Color Neural Activation and Behavior Control with Chrimson and CoChR in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **200**(4): 1029-1034.

Schmidt, T. M., M. T. Do, D. Dacey, R. Lucas, S. Hattar and A. Matynia (2011). "Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function." J Neurosci **31**(45): 16094-16101.

Schneider, F., C. Grimm and P. Hegemann (2015). "Biophysics of Channelrhodopsin." Annu Rev Biophys **44**: 167-186.

Sekirnjak, C., P. Hottowy, A. Sher, W. Dabrowski, A. M. Litke and E. J. Chichilnisky (2008). "High-resolution electrical stimulation of primate retina for epiretinal implant design." J Neurosci **28**(17): 4446-4456.

Stalmans, P., M. S. Benz, A. Gandorfer, A. Kampik, A. Girach, S. Pakola, J. A. Haller and M.-T. S. Group (2012). "Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes." N Engl J Med **367**(7): 606-615.

Sugano, E., H. Isago, Z. Wang, N. Murayama, M. Tamai and H. Tomita (2011). "Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy." Gene Ther **18**(3): 266-274.

Sugano, E., K. Tabata, M. Takahashi, F. Nishiyama, H. Shimizu, M. Sato, M. Tamai and H. Tomita (2016). "Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model." Gene Ther **23**(2): 158-166.

Tan, E., Q. Wang, A. B. Quiambao, X. Xu, N. M. Qtaishat, N. S. Peachey, J. Lem, S. J. Fliesler, D. R. Pepperberg, M. I. Naash and M. R. Al-Ubaidi (2001). "The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(3): 589-600.

Tochitsky, I., A. Polosukhina, V. E. Degtyar, N. Gallerani, C. M. Smith, A. Friedman, R. N. Van Gelder, D. Trauner, D. Kaufer and R. H. Kramer (2014). "Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells." Neuron **81**(4): 800-813.

Tomita, H., E. Sugano, N. Murayama, T. Ozaki, F. Nishiyama, K. Tabata, M. Takahashi, T. Saito and M. Tamai (2014). "Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1." Mol Ther **22**(8): 1434-1440.

Tomita, H., E. Sugano, H. Yawo, T. Ishizuka, H. Isago, S. Narikawa, S. Kugler and M. Tamai (2007). "Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelrhodopsin-2 gene transfer." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(8): 3821-3826.

Trapani, I., P. Colella, A. Sommella, C. Iodice, G. Cesi, S. de Simone, E. Marrocco, S. Rossi, M. Giunti, A. Palfi, G. J. Farrar, R. Polishchuk and A. Auricchio (2014). "Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors." EMBO Mol Med **6**(2): 194-211.

Tschuppert, S. and H. Gerding (2016). "Transient Subfoveal Fluid and Visual Loss after Ocriplasmin." Klin Monbl Augenheilkd **233**(4): 453-455.

Tshilenge, K. T., B. Ameline, M. Weber, A. Mendes-Madeira, S. Nedellec, M. Biget, N. Provost, L. Libeau, V. Blouin, J. Y. Deschamps, G. Le Meur, M. A. Colle, P. Moullier, V. Pichard and F. Rolling (2016). "Vitreotomy Before Intravitreal Injection of AAV2/2 Vector Promotes Efficient Transduction of Retinal Ganglion Cells in Dogs and Nonhuman Primates." Hum Gene Ther Methods **27**(3): 122-134.

Tsunematsu, T., T. S. Kilduff, E. S. Boyden, S. Takahashi, M. Tominaga and A. Yamanaka (2011). "Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice." J Neurosci **31**(29): 10529-10539.

Tsunematsu, T., K. F. Tanaka, A. Yamanaka and A. Koizumi (2013). "Ectopic expression of melanopsin in orexin/hypocretin neurons enables control of wakefulness of mice in vivo by blue light." Neurosci Res **75**(1): 23-28.

Twyford, P., C. Cai and S. Fried (2014). "Differential responses to high-frequency electrical stimulation in ON and OFF retinal ganglion cells." J Neural Eng **11**(2): 025001.

Vacca, O., H. Charles-Messance, B. El Mathari, A. Sene, P. Barbe, S. Fouquet, J. Aragon, M. Darche, A. Giocanti-Auregan, M. Paques, J. A. Sahel, R. Tadayoni, C. Montanez, D. Dalkara and A. Rendon (2016). "AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption." Hum Mol Genet.

Vacca, O., M. Darche, D. V. Schaffer, J. G. Flannery, J. A. Sahel, A. Rendon and D. Dalkara (2014). "AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers." Glia **62**(3): 468-476.

van Wyk, M., J. Pielecka-Fortuna, S. Lowel and S. Kleinlogel (2015). "Restoring the ON Switch in Blind Retinas: Opto-mGluR6, a Next-Generation, Cell-Tailored Optogenetic Tool." PLoS Biol **13**(5): e1002143.

Venkatesh, A., S. Ma, Y. Z. Le, M. N. Hall, M. A. Ruegg and C. Punzo (2015). "Activated mTORC1 promotes long-term cone survival in retinitis pigmentosa mice." J Clin Invest **125**(4): 1446-1458.

Weiland, J. D. and M. S. Humayun (2014). "Retinal prosthesis." IEEE Trans Biomed Eng **61**(5): 1412-1424.

Werginz, P., H. Benav, E. Zrenner and F. Rattay (2015). "Modeling the response of ON and OFF retinal bipolar cells during electric stimulation." Vision Res **111**(Pt B): 170-181.

Xiong, W., A. E. MacColl Garfinkel, Y. Li, L. I. Benowitz and C. L. Cepko (2015). "NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage." J Clin Invest **125**(4): 1433-1445.

Xue, T., M. T. Do, A. Riccio, Z. Jiang, J. Hsieh, H. C. Wang, S. L. Merbs, D. S. Welsbie, T. Yoshioka, P. Weissgerber, S. Stolz, V. Flockerzi, M. Freichel, M. I. Simon, D. E. Clapham and K. W. Yau (2011). "Melanopsin signalling in mammalian iris and retina." Nature **479**(7371): 67-73.

Ye, H., M. Daoud-El Baba, R. W. Peng and M. Fussenegger (2011). "A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice." Science **332**(6037): 1565-1568.

Yin, L., K. Greenberg, J. J. Hunter, D. Dalkara, K. D. Kolstad, B. D. Masella, R. Wolfe, M. Visel, D. Stone, R. T. Libby, D. Diloreto, Jr., D. Schaffer, J. Flannery, D. R. Williams and W. H. Merigan (2011). "Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(5): 2775-2783.

Yuasa, K., M. Yoshimura, N. Urasawa, S. Ohshima, J. M. Howell, A. Nakamura, T. Hijikata, Y. Miyagoe-Suzuki and S. Takeda (2007). "Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products." Gene Ther **14**(17): 1249-1260.

Yue, L., J. D. Weiland, B. Roska and M. S. Humayun (2016). "Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems." Prog Retin Eye Res **53**: 21-47.

Zein, W. M., B. G. Jeffrey, H. E. Wiley, A. E. Turriff, S. J. Tumminia, W. Tao, R. A. Bush, D. Marangoni, R. Wen, L. L. Wei and P. A. Sieving (2014). "CNGB3-achromatopsia clinical trial with CNTF: diminished rod pathway responses with no evidence of improvement in cone function." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(10): 6301-6308.

Zhang, Y., E. Ivanova, A. Bi and Z. H. Pan (2009). "Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration." J Neurosci **29**(29): 9186-9196.

Zhao, L., F. Wang, H. Wang, Y. Li, S. Alexander, K. Wang, C. E. Willoughby, J. E. Zaneveld, L. Jiang, Z. T. Soens, P. Earle, D. Simpson, G. Silvestri and R. Chen (2015). "Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 82 retinitis pigmentosa probands from Northern Ireland." Hum Genet **134**(2): 217-230.

Zhao, X., B. K. Stafford, A. L. Godin, W. M. King and K. Y. Wong (2014). "Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells." J Physiol **592**(7): 1619-1636.

Zinn, E., S. Pacouret, V. Khaychuk, H. T. Turunen, L. S. Carvalho, E. Andres-Mateos, S. Shah, R. Shelke, A. C. Maurer, E. Plovie, R. Xiao and L. H. Vandenberghe (2015). "In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector." Cell Rep **12**(6): 1056-1068.

Zulliger, R., S. M. Conley and M. I. Naash (2015). "Non-viral therapeutic approaches to ocular diseases: An overview and future directions." J Control Release **219**: 471-487.

Thèse de Doctorat

Baptiste AMELINE

Evaluation du transfert d'optogènes pour le traitement par thérapie génique d'un modèle canin de dystrophies rétiniennes héréditaires

Evaluation of optogene transfer for the treatment of a canine model of inherited retinal dystrophies

Résumé

La cécité ou la très grande malvoyance peut résulter de différentes pathologies comme les dystrophies rétiniennes héréditaires (DRH) caractérisées par la perte des photorécepteurs. Une des approches pour traiter les DRH est la thérapie génique spécifique, c'est à dire le remplacement du gène défectueux par un gène sain. Des études chez des modèles animaux de DRH ont démontré l'efficacité de la thérapie génique spécifique, et conduit au lancement d'essais cliniques. Malgré des résultats encourageants, la thérapie génique spécifique n'est pas toujours applicable, en particulier quand la dégénérescence est trop avancée ou si le gène muté est inconnu.

Pour traiter tous les cas de DRH, un nouvel axe de thérapie génique est envisagé : le transfert d'optogène. Cette stratégie consiste à réactiver la rétine devenue aveugle par l'expression de protéines photosensibles dans la rétine. Notre objectif est d'évaluer l'efficacité du transfert d'optogène chez un modèle canin naturellement déficient pour le gène Rpe65, provoquant une forme sévère de DRH proche de celles retrouvées chez l'homme.

La stratégie thérapeutique retenue est : L'injection intravitréenne, après vitrectomie, d'un vecteur recombinant dérivé du virus adéno-associé de sérotype 2 (rAAV2/2), portant le transgène optogénétique sous contrôle d'un promoteur fort et spécifique des tissus neuronaux : hSyn. Le but de ce projet est de transduire efficacement les cellules ganglionnaires rétiniennes d'un modèle canin déficient pour le gène Rpe65 et d'évaluer la photosensibilité des cellules transduites.

Mots clés

Thérapie génique – optogénétique – chien Rpe65 – AAV – DRH – vitrectomie – ChR2 – Opn4

Abstract

Inherited retinal diseases (IRD) affect about 2 million people worldwide, leading to severe visual impairment. Specific gene addition therapy is one of the most promising strategies to treat these patients. However many of them are not eligible for specific gene therapy, such as

- 1) Patients with unknown deficient genes
- 2) Patients beyond the therapeutic window
- 3) Patients whose the deficient gene is too large for AAV encapsidation
- 4) Patients undergoing a dominant form of IRD.

Therefore, the aim of this project is to develop an alternative strategy, independent of the mutation and the retinal degeneration kinetic: the optogene transfer. In context of IRD, it will consist to convert surviving retinal ganglion cells into sensitive light cells following the transfer of ChR2 or Opn4 optogene. Several rodent models of IRD have been successfully treated using these optogenes. Nevertheless, this approach has never been evaluated in large animal models. The objective of our study will be to define the feasibility of optogene transfer to restore vision in blind patients by evaluating the safety and the efficacy of AAV-mediated gene transfer of ChR2, eNpHR or Opn4, after vitrectomy, in ganglion cells of a canine model of IRD, the Rpe65-deficient dog.

Key Words

Gene therapy – optogenetics – Rpe65 dog – AAV – IRD – vitrectomy – ChR2 – Op4